

Tesis de Posgrado

Morfología funcional en el sistema respiratorio de mamíferos marinos

Crespo, Fabián Alberto

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Crespo, Fabián Alberto. (1998). Morfología funcional en el sistema respiratorio de mamíferos marinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3058_Crespo.pdf

Cita tipo Chicago:

Crespo, Fabián Alberto. "Morfología funcional en el sistema respiratorio de mamíferos marinos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3058_Crespo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**MORFOLOGÍA FUNCIONAL EN EL
SISTEMA RESPIRATORIO DE MAMÍFEROS
MARINOS**

Autor: Lic. FABIÁN ALBERTO CRESPO

Director: Dra. LILIA LAURÍA DE CIDRE

**Lugar de Trabajo: LABORATORIO DE HISTOLOGÍA ANIMAL,
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES, UNIVERSIDAD DE BUENOS
AIRES**

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
(Orientación en Ciencias Biológicas)**

1998

3058

- 8

A mi madre, que siempre me alentó
y me seguirá alentando.

A mi padre.

A Silvia.

La finalidad de la ciencia es buscar la explicación más simple de hechos complejos. Podemos caer en el error de pensar que los hechos son simples porque la simplicidad es el objeto de nuestra búsqueda. El lema de la vida de cada filósofo natural debería ser: busca la simplicidad y desconfía de ella.

Alfred North Whitehead

RESUMEN

MORFOLOGIA FUNCIONAL EN EL SISTEMA RESPIRATORIO DE MAMIFEROS MARINOS.

Los mamíferos marinos evolucionaron hacia la vida acuática luego que sus ancestros se habían adaptado al medio terrestre. La mayoría de las características morfológicas y fisiológicas de estos mamíferos se desarrollaron a partir de un plan de organización adaptado a la vida terrestre. Durante este proceso se sumaron innovaciones o adquisiciones particulares que surgieron exclusivamente durante la adaptación al nuevo ambiente. Debido a que conservaron la respiración aérea, la ventilación del aire y el intercambio de gases se convirtieron en los protagonistas de muchos ajustes morfológicos; más aún si se tiene en cuenta el incremento de la presión externa durante los buceos profundos. El objetivo general de la presente tesis es llevar a cabo un estudio comparado de la anatomía e histología del árbol traqueobronquial y parénquima pulmonar en seis especies de mamíferos marinos. Debido a las diferencias halladas en distintas partes de la arquitectura del sistema respiratorio en las especies estudiadas, como ser: en la ramificación de las vías extrapulmonares, en el patrón de ramificación del árbol bronquial, en la histología de las vías aéreas, en la distribución del cartílago en las vías aéreas terminales, en la presencia de esfínteres musculares en las vías aéreas terminales y en la morfometría alveolar; se propone un análisis comparado que permita plantear distintas hipótesis funcionales para estas adquisiciones estructurales, como así también comprender las distintas presiones ambientales que influyeron en el diseño del sistema respiratorio en los mamíferos marinos.

Palabras clave : sistema respiratorio, pulmones, mamíferos marinos, anatomía, histología.

ABSTRACT

FUNCTIONAL MORPHOLOGY IN THE RESPIRATORY SYSTEM OF MARINE MAMMALS

After their ancestors had been adopted to the terrestrial medium, the marine mammals had evolved to their aquatic life. Most of the morphological and physiological features of these mammals had been developed from an organized plan adapted to the terrestrial life. During their adaptation in this new habitat some special innovations were added. This mammals became the protagonist of many morphological adjustments because they have kept the air respiration which involves air ventilation and the interchange of gases, even more if the increase of the external pressure during deep dives is taken into consideration. The principal aim of this Thesis is to make a comparative study of the anatomy and histology of the tracheobronchial tree and pulmonar parenchima, in six different species of marine mammals. Since there has been found some differences in the architecture of the respiratory system in these animals such as: in the ramification of both the extrapulmonary airways and the bronchial tree, in the histology of the airways, in the distribution of the cartilage in the terminal airways, in the presence of muscular sphincters in the terminal airways, and also in the morphometry of the alveolus; a comparative analysis is proposed which can give raise to some functional hypothesis for the structural acquisitions, and also try to understand how the different ambiental pressures had influenced on the design of the respiratory system of marine mammals.

Keywords : respiratory system, lungs, marine mammals, anatomy, histology.

INDICE

1. INTRODUCCION GENERAL	1 - 2
2. BIOLOGIA GENERAL DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS	3 - 11
2.1 Orden Pinnipedia: breve reseña taxonomica y evolutiva	3
2.2 Caracteristicas generales de los pinnipedos estudiados	4
2.3 Comportamiento de buceo en los pinnipedos estudiados	5
2.4 Orden Cetacea: breve reseña taxonomica y evolutiva	6
2.5 Caracteristicas generales de los cetaceos estudiados	6 - 7
2.6 Comportamiento de buceo en los cetaceos estudiados	8 - 10
3. ASPECTOS GENERALES DE LA FISIOLOGIA DEL BUCEO EN PINNIPEDOS Y CETACEOS	12 - 17
3.1 Respuestas cardiovasculares	12 - 13
3.2 Respuestas metabolicas	13 - 14
3.3 Buceos naturales vs. buceos forzados	14 - 16
3.4 Estrategias generales de buceo: ¿nadadores o buceadores?	16 - 17
4. EL SISTEMA RESPIRATORIO EN PINNIPEDOS Y CETACEOS	18 - 24
4.1 Caracteristicas anatomo-histologicas generales	18 - 20
4.2 Vias aereas terminales: una region altamente especializada	20 - 21
4.3 Parenquima alveolar: ¿una region altamente especializada?	21 - 23
5. OBJETIVOS DE LA TESIS	25 - 26
6. MATERIALES Y METODOS	27 - 41
6.1 Obtención de las muestras estudiadas	27
6.2 Tipo de muestreo	27 - 29
6.2.1 Obtención de sistemas respiratorios de adultos de <i>O.flavescens</i> y <i>A.australis</i>	27 - 28
6.2.2 Obtención de sistemas respiratorios de adultos de <i>P.blainvillei</i> , <i>L.obscurus</i> , <i>P.spinipinnis</i> y <i>D. delphis</i>	28
6.2.3 Obtención de sistemas respiratorios de cachorros de <i>O.flavescens</i>	28 - 29
6.3 Número de ejemplares procesados	29
6.4 Análisis anatómico	30 - 33

6.4.1 Vías aéreas extrapulmonares _____	30
6.4.2 Pulmón _____	30
6.4.2.1 Vías aéreas intrapulmonares mayores _____	30 -31
6.4.2.2 Vías aéreas intrapulmonares menores _____	31
a) Estudio mediante moldes de resina _____	32
b) Estudio mediante cortes seriados _____	33
b1) Vías aéreas terminales _____	33
b2) Glándulas de la mucosa traqueobronquial _____	33
6.5 Análisis histológico _____	33 - 39
6.5.1 Técnicas histológicas para microscopía óptica _____	33 - 34
6.5.1.1 Técnicas histológicas topográficas _____	34
6.5.1.2 Técnicas histoquímicas _____	34 - 38
a) PAS _____	35 - 36
b) Método de oxidación selectiva del ácido siálico de glicanos sialatados _____	36
c) Método de azul alcián para detección de glicoconjugados sulfatados y carboxilados _____	36 - 37
d) Método de Mowry _____	37
e) Técnica de mercurio y azul de bromofenol _____	38
f) Técnica de sulfato de azul de nilo _____	38
g) Técnica de Sudan III _____	38
h) Técnica de orceína nítrica _____	38
6.5.2 Técnicas para microscopía electrónica _____	38 - 39
6.5.3 Análisis digital de imágenes: morfometría alveolar _____	39
 7. RESULTADOS _____	 42 - 142

PARTE 1

MACROANATOMIA Y MICROANATOMIA DEL ARBOL TRAQUEOBRONQUIAL Y DEL PARENQUIMA PULMONAR EN *Arctocephalus australis*, *Otaria flavescens* (Pinnipedia) Y *Pontoporia blainvillei* (Cetacea). COMPARACIONES CON OTROS MAMIFEROS MARINOS.

7.1 ESTUDIO COMPARADO DEL PATRON DE RAMIFICACION DE LAS VIAS EXTRA-PULMONARES.

7.1.1	Introducción	42 -43
7.1.2	Resultados	43 - 48
7.1.2.1	Largo y diámetro traqueal	43
7.1.2.2	Tráquea y bronquios primarios: relaciones morfométricas	43 - 44
7.1.3	Discusión	49 - 51

7.2 MORFOLOGIA DE LOS PULMONES Y DEL ARBOL BRONQUIAL MAYOR

7.2.1	Introducción	52 - 54
7.2.2	Resultados	54 - 64
7.2.2.1	Lobulación pulmonar	54
7.2.2.2	Patrón de ramificación bronquial	55
7.2.2.3	Morfometría de las vías aéreas mayores	56
7.2.3	Discusión	65 - 68

7.3 ESTUDIO COMPARADO DE LA HISTOLOGIA DEL ARBOL TRAQUEO BRONQUIAL Y PARENQUIMA ALVEOLAR

7.3.1	Introducción	69 - 70
7.3.2	Resultados	70 - 95
7.3.2.1	Vías aéreas extrapulmonares	70 -76
7.3.2.2	Pulmón	76 - 80
a)	Morfología interna: definición de la microanatomía pulmonar	76 - 77
b)	Vías aéreas intrapulmonares: problemas relacionados con su denominación	77
c)	Histología del árbol bronquial	78 - 79
7.3.2.3	Parénquima pulmonar	80
7.3.3	Discusión	96 - 99

PARTE 2

ANALISIS MORFOLOGICO E IMPLICANCIAS FUNCIONALES DE DOS CARACTERISTICAS SOBRESALIENTES DE LAS VIAS AEREAS:

El cartílago de las vías terminales y los esfínteres bronquiales.

7.4 ESTUDIO DEL DESARROLLO POSTNATAL DEL CARTILAGO EN LAS VIAS AEREAS TERMINALES DE *Otaria flavescens*

7.4.1 Introducción	100
7.4.2 Resultados	101 - 109
7.4.2.1 Histología general de las vías aéreas terminales	101
7.4.2.2 Histogénesis del cartílago en las vías aéreas terminales	101 - 103
7.4.2.3 Morfometría del cartilago de las vías aéreas terminales	103 - 104
7.4.2.4 Aspectos generales del comportamiento de buceo en los cachorros	104 - 105
7.4.3 Discusión	110 - 112

7.5 ESTUDIO COMPARADO DE LOS ESFINTERES BRONQUIALES EN CETACEOS: *Pontoporia blainvillei* y *Lagenorhynchus obscurus*.

7.5.1 Introducción	113 - 114
7.5.2 Resultados	114 - 119
7.5.2.1 Esfínteres mioelásticos en <i>P.blainvillei</i>	114 - 115
7.5.2.2 Esfínteres mioelásticos en <i>L.obscurus</i>	115 - 116
7.5.3 Discusión	120 - 125
7.5.3.1 ¿Quiénes realmente poseen esfínteres mioelásticos?	121 - 122
7.5.3.2 Esfínteres mioelásticos y profundidades de buceo	123 - 124
7.5.3.3 Esínteres mioelásticos y patrones de ventilación	124

PARTE 3

MORFOMETRIA ALVEOLAR EN PINNIPEDOS Y CETACEOS:

Las diferencias estructurales, ¿se asocian a distintas demandas de oxígeno?

7.6 ESTUDIO COMPARADO DE LA MORFOMETRIA ALVEOLAR EN PINNIPEDOS Y CETACEOS: *Arctocephalus australis*, *Otaria flavescens*, *Pontoporia blainvillei*, *Lagenorhynchus obscurus* y *Phocaena spinipinnis*

7.6.1 Introducción	126 - 127
7.6.2 Resultados	128 - 136
7.6.2.1 Análisis del perímetro alveolar	128
7.6.2.2 Análisis del diámetro equivalente	128
7.6.2.3 Análisis de la relación entre largo máximo y largo mínimo alveolar	129
7.6.2.4 Análisis del perímetro alveolar total	129 - 130
7.6.2.5 Análisis del área alveolar total	130

7.6.2.6 Variables respiratorias _____	130 - 131
7.6.2.7 Morfometría alveolar, variables respiratorias y comportamiento de buceo _____	131
7.6.3 Discusión _____	137 - 142
7.6.3.1 Perímetros alveolares similares, volúmenes pulmonares distintos _____	137 - 138
7.6.3.2 Delfines, morfometría alveolar y consumo de oxígeno: ¿Distintas estrategias? _____	138 - 139
7.6.3.3 Morfología alveolar, consumo de oxígeno y profundidades de buceo _____	140
7.6.3.4 Cambios en la morfología alveolar en los mamíferos marinos: ¿el ajustarse a distintas demandas de oxígeno fue la única presión evolutiva? _____	141 - 142
 8. DISCUSION Y CONCLUSIONES GENERALES DE LA TESIS _____	 143 - 148
 9. BIBLIOGRAFIA _____	 149 - 160

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los mamíferos marinos evolucionaron hacia la vida acuática luego que sus ancestros se habían adaptado al medio terrestre. La mayoría de las características morfológicas y fisiológicas de estos mamíferos se desarrollaron a partir de un plan de organización adaptado a la vida terrestre, a las que se sumaron innovaciones o adquisiciones particulares que surgieron exclusivamente durante la adaptación al nuevo ambiente.

Debido a que conservaron la respiración aérea, el intercambio de gases y la administración del oxígeno se convirtieron en protagonistas de muchos ajustes morfológicos y fisiológicos. Los problemas que plantea la actividad subacuática son diversos. La respiración, la circulación y el metabolismo en los mamíferos marinos están caracterizados por una compleja interrelación estructural, funcional y comportamental, no del todo descriptas y claramente comprendidas (Leith, 1989).

La adaptación a la vida acuática se encuentra en casi todos los órdenes de los mamíferos, con excepción de los quirópteros, los lagomorfos, los marsupiales y los primates. El hecho de que todos los buceadores parecen haber utilizado mecanismos comunes para la vida subacuática, y que algunos de estos mecanismos están presentes en los mamíferos no acuáticos, sugiere que las especies mejor adaptadas al buceo han tomado ventaja y han desarrollado algunos mecanismos preexistentes (Schmidt-Nielsen, 1979).

Particularmente, el sistema respiratorio de los pinnípedos y los cetáceos presenta numerosas características anatómicas e histológicas que reflejan adaptaciones asociadas a la capacidad de ajustarse a las elevadas presiones que deben soportar en las inmersiones. Otras modificaciones del sistema respiratorio se asocian con los mecanismos ventilatorios, caracterizados por rápidas ventilaciones en superficie, en donde importantes volúmenes de aire deben ser exhalados e inhalados durante cortos intervalos de tiempo (Wislocki, 1929).

Los estudios acerca de la anatomía e histología del sistema respiratorio de los mamíferos acuáticos se concentraron en unas pocas especies, como por ejemplo aquellos realizados por Wislocki (1929) en *Tursiops truncatus*; Gouddappel y Slijper (1958) en *Hyperoodon ampullatus*; Boshier y Hill (1974) en *Leptonychotes weddelli*; Fanning y Harrison (1974) en

Tursiops truncatus; Boyd (1975) en *Leptonychotes weddellii*; De Carlo y col.(1976) en *Leptonychotes weddellii*; y Henk y Haldiman (1990) en *Balaena Mysticetus*. Desde un enfoque anatómo-histológico comparado, pueden citarse los trabajos de Belanger (1940) en *Phoca vitulina*, *Trichechus latirostris*, *Tursiops truncatus*, *Delphinapterus leucas*, *Physeter macrocephalus*, *Megaptera nodosa*, *Balaenoptera physalis*, y *Balaenoptera sibbaldii*; y el de Wislocki y Belanger (1940) en *Balaenoptera sibbaldii*, *Balaenoptera physalis*, y *Physeter megalocephalus*.

Solamente Kooyman (1971), y Leith (1989) encararon una revisión sobre la morfología funcional del sistema respiratorio en mamíferos acuáticos.

Es, probablemente debido a la difícil obtención de las muestras biológicas, que la mayoría de estos trabajos solo reflejaron un aspecto parcial de los ajustes morfológicos del sistema a la vida subacuática.

Cuando las conclusiones extraídas a partir del estudio de una especie o de un grupo taxonómico restringido (pinnípedos o cetáceos), se amplía a un análisis comparado, las interpretaciones morfológico-funcionales pueden variar (Leith,1989).

Algunas de las variantes estructurales del sistema respiratorio de los mamíferos marinos parecen ajustarse a una estrategia general en la conquista del ambiente acuático, pero en algunos casos se presentan variantes que probablemente respondan a presiones ambientales específicas.

Cabe entonces preguntarse: ¿todas las especies explotaron las adquisiciones estructurales de la misma forma?; ¿hasta qué punto pequeñas variaciones en los hábitos particulares de cada especie, pueden asociarse con diferencias estructurales en el sistema respiratorio? Estas preguntas se convirtieron en el eje conductor del presente trabajo de Tesis.

2. BIOLOGÍA GENERAL DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

2.1 Orden Pinnipedia: breve reseña taxonómica y evolutiva

Los lobos y leones marinos, focas y morsas se consideran pertenecientes al Orden Pinnipedia (Eisenburg,1981; Novak y Paradiso,1983), al cual pertenecen alrededor del 28% de las especies de los mamíferos marinos existentes (Riedman,1990). No obstante, algunos autores los consideran como un Suborden dentro del Orden Carnívora (King,1983; Young,1985).

La controversia existente acerca de si los pinnípedos conforman un Orden diferente al de los carnívoros terrestres (Fisipedia) continúa en la actualidad. Los Pinnipedia se clasifican en dos superfamilias: Otarioidea y Phocoidea. A la primera de éstas, pertenecen los lobos y leones marinos (Familia Otariidae) y las morsas (Familia Odobenidae); a la segunda superfamilia pertenecen las focas y los elefantes marinos.

Los pinnípedos se originaron hace unos 22-25 millones de años, a partir de formas terrestres carnívoras o fisipedios (Repenning y Tedford,1977), estando aun en discusión su posible origen monofilético o difilético (Wyss,1987; Berta y Clayton,1984). La postura monofilética está basada en estudios a nivel molecular, que involucran el análisis comparado de proteínas séricas y del ARN de las especies actuales. Berta (1987), propuso un origen monofilético basado en el estudio de un fósil prácticamente completo del ancestro de los pinnípedos (Enaliarctidae). Si los pinnípedos poseen un ancestro común, las proteínas séricas y el ADN de los otáridos y fócidos deberían presentar una mayor similitud entre sí que con otros grupos de mamíferos. Si los pinnípedos son difiléticos, los fócidos y otáridos deberían presentar mayores semejanzas con sus ancestros hipotéticos mas directos, como las nutrias y los osos respectivamente.

Estudios de la similitud de las proteínas séricas (de Jong,1982) y estudios comparados del ADN de otáridos y fócidos (Arnason y Widegren,1986), demuestran mayor similitud entre ambos grupos, que con otros grupos de mamíferos.

Sin embargo, el registro fósil favorece a los que sostienen la postura difilética, mientras que los estudios moleculares aportan información que favorece la postura monofilética.

2.2 Características generales de los pinnípedos estudiados

- Superfamilia Otarioidea

Familia Otariidae

-Arctocephalus australis (Zimmermann,1783) (Lobo marino peletero Sudamericano)

Al igual que la mayoría de los otáridos, es una especie poligínica y sexualmente dimórfica. Los machos, de pelaje castaño oscuro, (Figura 1a) pueden alcanzar un máximo de 188 cm, y 159 kg. y las hembras, de coloración mas clara, alcanzan un máximo de 142 cm. y 49 kg. (Vaz Ferreira y Ponce de Leon,1987). El lobo marino peletero sudamericano se distribuye a lo largo de las costas de los océanos Atlántico y Pacífico en Sudamérica, pero no lo hace de forma continua, sino que está asociado a zonas de alta productividad primaria y secundaria (Cappozzo, 1991). La temporada de reproducción transcurre durante los meses de noviembre y diciembre. Los machos son territoriales y permanecen en tierra durante la temporada de reproducción, ayunando hasta un máximo de 60 días (Vaz Ferreira y Ponce de Leon,1987). Las hembras entrarían en estro entre el quinto y octavo día posterior al parto. Al igual que todos los otáridos, luego de producida la cópula las hembras alternan periodos de alimentación en el mar con estancias en tierra de duración variable y que comprenden los periodos durante los cuales las hembras amamantan a sus crías.

-Otaria flavescens (Shaw,1800) (León marino Sudamericano)

Los machos adultos (Figura 1b) son de mayor peso que las hembras adultas; pueden alcanzar 3 metros de longitud y superar los 300 kg. de peso (Cappozzo y Rosas,1991) mientras que las hembras alcanzan 1,8 metros de longitud y 140 kg. de peso. Las crías, presentan también un dimorfismo sexual marcado desde el momento de nacer (Cappozzo y col.,1991). El rango de distribución de la especie abarca las costas de Sudamérica (King,1983). Posee una estación reproductiva anual que transcurre desde mediados de diciembre hasta mediados de febrero en toda su área de distribución (Campagna y Le Bouef, 1988; Cappozzo y Rosas,1991). Los primeros en llegar a los apostaderos de reproducción son los machos, muchos de los cuales permanecen en el área de cría ayunando durante la temporada reproductiva. Los primeros nacimientos se producen en la segunda quincena de diciembre (Campagna y Le Bouef,1988).

2.3 Comportamiento de buceo de los pinnípedos estudiados

Es escasa la información disponible sobre el comportamiento de buceo en las especies estudiadas. La mayor parte de la información se basa en observaciones indirectas de la actividad subacuática, como las realizadas desde la costa o desde un bote de observación, o las registradas por capturas accidentales en redes de pesca. Sin embargo, tanto el lobo marino peletero (*A.australis*) como el león marino (*O.flavescens*) fueron estudiados en sus ambientes naturales (Trillmich y col.,1986; Majluf,1987; Werner y Campagna,1995), mediante la utilización de registradores de tiempo y profundidad de buceo (TDR), pero en muchos casos dado la difícil captura, manipulación y recaptura de los individuos a los que se les colocó el TDR, el número de los ejemplares de los que se pudo extraer información es bajo y se concentra principalmente en las hembras y/o juveniles.

El patrón de buceo general de las hembras adultas del león marino (*O.flavescens*), estudiadas en la costa patagónica durante la temporada reproductiva, consiste en una serie relativa de buceos de corta duración y poca profundidad. La mayoría de las hembras presentan buceos mesopelagicos, con excursiones verticales (Werner y Campagna, 1995)(Tabla 1).

Los buceos desarrollados por el lobo marino peletero (*A.australis*), son en su mayoría de duración similar y con profundidades medias inferiores a las obtenidas para el león marino sudamericano. El porcentaje de tiempo empleado en el buceo es menor (Trillmich y col.,1986)(Tabla 1).

Tabla 1: Variables registradas para buceos naturales en hembras de *A.australis* y *O.flavescens*.

Especie	Buceo		Intervalo en superf. (min)	% tiempo de buceo	Ref.
	Durac. media(min)	Profun. media(mts)			
<i>A.australis</i>	2,5	30(a)		74	(b)
<i>O.flavescens</i>	2,5	45	1,1	52,7	(c)

Ref:referencias,(a) Majluf (1987); (b) Trillmich y col,1986; (c) Werner y Campagna,1995.

2.4 Orden Cetacea: breve reseña taxonómica y evolutiva

Los fósiles de los cetáceos mas antiguos encontrados, provienen de depósitos continentales del Eoceno temprano, lo que implica una antigüedad estimada en 50 millones de años. Compartirían un antecesor común con los Artiodáctilos (Ungulados).

Es probable que los primeros cetáceos vivieran en aguas costeras poco profundas, desarrollando hábitos anfibios y facilitando la fijación de adaptaciones cada vez mas específicas para el desenvolvimiento permanente en el medio acuático (Young, 1985).

A mediados del Eoceno (40 m.a.) la mayoría de los ancestros de los cetáceos habían desarrollado las aletas y habían perdido las extremidades posteriores. A principios del Oligoceno se originan dos grupos de cetáceos, reunidos en la actualidad en dos Subórdenes: Odontoceti ("cetáceos con dientes") y Mysticeti ("cetáceos sin dientes"). Dentro del primero se inscriben cuatro Superfamilias: Platanistoidea (que incluye a la Familia Pontoporiidae), Delphinoidea (que incluye las Familias Phocoenidae y Delphinidae), Ziphiidae y Physeteroidea. El Suborden Mysticeti presenta cuatro Familias: Balaenidae, Neobalaenidae, Eschrichtiidae y Balaenopteridae (Klinowska, 1991).

En muchos aspectos los cetáceos han experimentado una "regresión" hacia las características de la forma de vida de los peces, lo cual se pone de relieve ante todo en su morfología, con la cabeza alargada, ausencia de cuello y cuerpo terminado en punta, hidrodinámico (Young, 1985).

2.5 Características generales de los cetáceos estudiados

- Suborden Odontoceti

Familia Pontoporiidae

-Pontoporia blainvillei (Gervais y d'Orbigny, 1844) (Delfín franciscana)

Los machos de esta especie (Figura 1c) muestran una talla en el adulto de 131 cm, y un peso corporal de 25-29 kg. (Monzon y Corcuera, 1990). Las hembras maduran sexualmente al alcanzar una talla de 140 cm. y un peso de 33-34 kg.. Se distribuyen en aguas costeras, desde Brasil hasta Argentina. El golfo San Matías (Patagonia, Argentina) es considerado

su límite austral (Crespo y Harris,1991). Ocasionalmente se han hallado fransiscanas en el Río de la Plata.

- Suborden Odontoceti

Familia Delphinidae

-Lagenorhynchus obscurus (Gray,1828) (Delfín oscuro)

El delfín oscuro (Figura 1d) tiene distribución circumpolar en aguas templadas y templado-frías del Hemisferio Sur. En las costas del océano Pacífico se distribuye hasta el Perú, mientras que en las costas del Atlántico Sudoccidental se lo cita desde Mar del Plata hasta Tierra del Fuego (Crespo,1991). La longitud máxima registrada para los machos es de 2,11 mts y para las hembras es de 1,93 (Leatherwood y Reeves,1983).

- Suborden Odontoceti

Familia Delphinidae

-Delphinus delphis (Linnaeus,1758) (Delfín común)

El delfín común (Figura 1e) es una especie cosmopolita presente en aguas tropicales y templado cálidas, se trata de un delfín pelágico y de costumbres gregarias (Gonzalez,1991). El macho mas grande que fue reportado llego a los 2,6 mts, y el registro para una hembra fue de 2,3 mts (Klinowska,1991).

- Suborden Odontoceti

Familia Phocoenidae

-Phocaena spinipinnis (Burmeister,1865) (Marsopa espinosa)

La distribución de esta especie es continua desde las costas de Perú hasta Tierra del Fuego, y desde allí hasta Santa Catarina, Brasil (Goodall y col.,1990).

Brownell y Praderi (1982) señalaron que la marsopa espinosa (Figura 1f) podría ser el pequeño cetáceo mas abundante en las aguas del Atlántico Sur. Esta especie no se encuentra siempre restringida a aguas muy costeras, a pesar de ser vista en Tierra del Fuego muy cerca de la costa, e incluso remontando ríos y fiordos (Goodall y Col.,1990).

2.6 Comportamiento de buceo en los cetáceos estudiados

Los registros sobre el comportamiento de buceo en la mayoría de las especies de los cetáceos estudiados se basan principalmente en observaciones de campo o datos sobre capturas incidentales en redes de pesca.

P.blainvillei prefiere hábitats extremadamente costeros, de aguas poco profundas (Corcuera y col.,1994). En la costa de la Provincia de Buenos Aires, el 47,5% de los individuos capturados incidentalmente en redes de enmalle se ahogaron en un rango de profundidad de 2-10 metros, con un 95% capturado entre los 2-40 mts., sugiriendo un intervalo preferencial cerca de los 35 mts (Tabla 2). Durante los intervalos en superficie, nadan en forma tranquila, exhibiendo en varias ocasiones toda su cabeza; nunca han sido vistos saltando (Monzon y Corcuera,1991). El tiempo medio de buceo fue de 18 segundos (Bordino y Thompson, 1997); sin embargo estos autores observaron en la distribución de frecuencias de los tiempos de buceo un patrón bimodal, cuyos componentes son buceos cortos (moda: 6-10 seg) y buceos largos (moda: 51-55 seg). Los buceos largos se registraron durante los periodos de alimentación, mientras que los buceos cortos se presentaron durante el movimiento direccional (Bordino y Thompson,1997).

L.obscurus presenta en superficie una actividad mayor que el delfín del Plata (*P.blainvillei*), desarrollando un espectro variado de saltos. En la zona de Península Valdés, un ejemplar de delfín oscuro fue seguido por radio hasta una distancia de unos 50 km mar adentro (Lichter, 1992). Wursig y Wursig (1980), sugieren que las profundidades medias de los territorios en donde se registran a los delfines oscuros alimentándose, varían estacionalmente.

La profundidad media del agua (*) durante los períodos de alimentación dependía de la época del año en relación al ambiente que frecuentaban, en febrero el ambiente frecuentado presentaba 41 mts, para luego desplazarse a ambientes de hasta 21 mts de profundidad en el mes de septiembre. El tiempo promedio de buceo registrado fue de 21 segundos (Wursig y Wursig,1980).

(*) Wursig y Wursig (1980), evaluaron la profundidad de buceo de los delfines en base a la profundidad medida en la región de los avistajes, por eso se utiliza el término: profundidad del agua

Existen registros de dos delfines oscuros que fueron capturados accidentalmente en redes de pesca a una profundidad de 50-60 mts. (Corcuera y col.,1994) (Tabla 2).

P.spinipinnis puede hallarse por los menos hasta unos 50 km de la costa , y la profundidad promedio de los registros de capturas incidentales por redes de pesca puede llegar hasta 60 mts (Corcuera y col.,1994).

La localización de sus capturas en redes en el área de Necochea, Argentina, muestra que su presencia en aguas bonaerenses es muy poco probable entre 1 y 30 mts de profundidad, aumentando la frecuencia de sus capturas en profundidades superiores a los 30 mts (Corcuera y col.,1994) (Tabla 2).

La natación de la marsopa espinosa es calma y apenas perturba la superficie, exhibiendo su particular aleta dorsal, único rasgo característico de la identidad de la especie en el agua (Corcuera,1991).

Presenta inmersiones prolongadas, permaneciendo poco tiempo en superficie. Estos animales emplean aproximadamente 0,5 seg. para exhalar y 0,5 seg. para inhalar, y el tiempo entre cada ventilación (inhalación y exhalación) es de 0,7 segundos (Wursig y col,1977).

D.delphis presenta un comportamiento de buceo bimodal, en el que se registran buceos poco profundos o superficiales que oscilan entre 2-10 mts, y buceos nocturnos de alimentación que se desarrollan en un rango de 20-80 mts de profundidad (Gaskin,1982).

El único ejemplar capturado en redes de pesca en Necochea, Argentina, se obtuvo a una profundidad entre 10-20 mts aproximadamente (Corcuera y col.,1994) (Tabla 2).

El delfín común presenta una veloz natación, la que incluye espectaculares saltos fuera del agua (Lichter, 1992).

Tabla 2: Variables registradas para buceos naturales en *Pontoporia blainvillei*, *Lagenorhynchus obscurus*, *Phocaena spinipinnis* y *Delphinus delphis*.

Especie	Profundidad de buceo (mts)	Tipo de registro	Referencia
<i>P.blainvillei</i>	2 - 10 (1) 2 - 40 (2)	Redes de pesca	Monzon y Corcuera (1991) Bordino e Iñiguez (1996)
<i>L.obscurus</i>	50 - 60	Redes de pesca	Corcuera y col. (1994)
<i>P.spinipinnis</i>	30 - 60	Redes de pesca	Corcuera y col. (1994)
<i>D.delphis</i>	2 - 10 (3) 20 - 80 (4) 10 - 20 (5)	Redes de pesca y radiotelemetría	Gaskin (1982) Corcuera y col.(1994)

(1) Profundidad correspondiente al 47,5% de las capturas; (2) Profundidad correspondiente al 95% de las capturas; (3) Buceos diurnos; (4) Buceos nocturnos de alimentación; (5) Registro por red de pesca para un solo ejemplar.



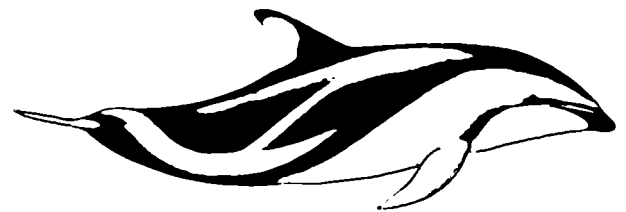
1a- *Arctocephalus australis*



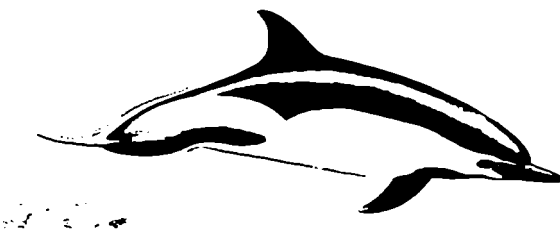
1b- *Otaria flavescens*



1c- *Pontoporia blainvillei*



1d- *Lagenorhynchus obscurus*



1e- *Delphinus delphis*



1f- *Phocaena spinipinnis*

Figuras 1: Especies de mamíferos marinos estudiadas (Pinturas de Guillermo Harris, en Lichter, 1992)

3. ASPECTOS GENERALES DE LA FISIOLÓGÍA DEL BUCEO EN PINNIPEDOS Y CETÁCEOS

3.1 Respuestas cardiovasculares

El buceo en los mamíferos marinos se desarrolla por una serie de cambios fisiológicos comprendidos en un proceso global denominado reflejo de buceo. Este reflejo fue estudiado y su mecanismo fue comprendido en animales cautivos y mediante buceos forzados (Renouf,1991). En estas condiciones la mayoría de los animales estudiados (principalmente pinnípedos), reflejaban una profunda bradicardia, durante la cual la tasa cardíaca podía descender hasta el 10 % de los valores normales (Scholander,1940; Andersen,1966; Elsner y col.,1970; Liggins y col.,1980). La caída mas abrupta e intensa de la tasa cardíaca ocurre en los fócidos, y la menos pronunciada en el manatí (Kooyman,1989). El descenso en el ritmo cardíaco llegó a registrarse también en fetos de la foca de Weddell (*Leptonychotes weddelli*) durante las inmersiones de las hembras preñadas (Kooyman,1989).

El volumen sistólico en algunas especies, como el león marino de California (*Zalophus californianus*) y la foca común (*Phoca vitulina*), se mantiene constante , mientras que en la foca de Weddell el volumen sistólico desciende desde un 30 a un 50% (Zapol y col.,1979). Las razones para explicar estas diferencias no son del todo claras, y probablemente respondan en gran medida, a diferentes condiciones experimentales (Kooyman,1989). A pesar de la disminución del volumen sistólico, existen ajustes vasculares que mantienen la presión arterial constante, y esto se debe en gran parte a un incremento en la resistencia vascular periférica (Sinnott y col.,1978). Algunos tejidos se verán disminuídos en sus niveles de irrigación con la consecuente disminución de los niveles de oxígeno, como ocurre en los músculos y en órganos como los riñones (Elsner,1978; Zapol y col.,1979).

El cerebro y los pulmones mantienen niveles normales de irrigación (Kooyman y col.,1981). El corazón parece declinar parcialmente su abastecimiento normal de sangre durante las inmersiones (Zapol y col.,1979).

Las anastomosis arteriovenosas parecen jugar un rol importante en la distribución del flujo sanguíneo de algunos órganos; estos puentes vasculares podrían intervenir como pasajes para desviar el riego de sangre bajo distintas circunstancias (Kooyman, 1989).

En numerosas especies de mamíferos acuáticos se encontró un mayor volumen total de sangre, un mayor número de glóbulos rojos y una mayor concentración de hemoglobina, sumado a un incremento de la mioglobina muscular, si se las compara con especies de mamíferos terrestres de talla similar (Kooyman, 1973; Kooyman, 1985).

3.2 Respuestas metabólicas

La existencia de períodos prolongados sin intercambio gaseoso, como consecuencia de buceos prolongados, implican un déficit de oxígeno, que trae aparejado la acumulación de ácido láctico (AL) en sangre. El músculo es su principal productor (Murphy y col., 1980). Esto conduce al desarrollo de mecanismos alternativos para llevar a cabo los ajustes fisiológicos correspondientes durante los períodos de bajo nivel de oxígeno: a) aumento en la actividad y/o concentración de enzimas glicolíticas, para maximizar la obtención de energía (Hochachka y Storey, 1975), b) recuperación eficiente de la anaerobiosis, utilizando el AL producido durante el buceo, y c) un equilibrio del balance redox (1:1), conducente a impedir que las células permanezcan en un estado de reducción elevado (Kooyman y col., 1981).

La clase y cantidad de enzimas reguladoras presentes en etapas metabólicas claves, se han regulado para facilitar un equilibrio eficiente entre la aerobiosis y la anaerobiosis (Hochachka y Storey, 1975).

El metabolismo basal de muchos mamíferos marinos es 1-3 veces mayor que el de los mamíferos terrestres de talla similar. La tasa metabólica de estas especies no puede ser medida usando calorimetría indirecta (por ejemplo: consumo de oxígeno); es por eso que la mayoría de los investigadores usan la deuda de oxígeno post-buceo como un indicador de la tasa metabólica; la deuda de oxígeno se define como el oxígeno adicional consumido durante la recuperación en superficie (Kooyman y col., 1981).

La tasa metabólica calculada en base a la deuda de oxígeno representaría una tasa metabólica que puede considerarse como de rutina (*) mas que basal. Algunos estudios revelaron que luego de buceos sucesivos la deuda de oxígeno era menor a la esperada, lo que sugería que durante la inmersión, la tasa metabólica disminuiría (Kooyman y col.,1981).

Según lo expuesto anteriormente, existe una gran flexibilidad en la redistribución de la sangre, y algunos órganos pueden posponer y reducir su actividad durante el buceo. Este mecanismo podría reducir las necesidades energéticas del organismo (Kooyman,1989).

3.3 Buceos naturales vs. buceos forzados

Dado que la mayoría de los mamíferos marinos pueden desarrollar apneas prolongadas, los mecanismos asociados a este fenómeno fueron el principal tema de estudio durante muchos años.

La mayor parte de estas investigaciones se llevaron a cabo en condiciones artificiales o de laboratorio, forzando al animal en estudio a la realización de los buceos (Scholander y col., 1941 ; Murdaugh y col. , 1966 ; Olsen y col. , 1969; Kooyman y col.,1972; Sinnett y col.,1978; Murphy y col.,1980; Kjekshus y col.,1982; Castellini y col.,1985; Reed,1994). Los objetivos de estos trabajos fueron los de analizar los mecanismos que desencadenaban una respuesta máxima para la conservación del oxígeno y los mecanismos de defensa contra la asfixia. Estos conceptos se reunieron la expresión "reflejo de buceo".

Sin embargo, el estudio de la fisiología del buceo de los mamíferos marinos en inmersiones desarrolladas a voluntad en ambientes naturales, parecen revelar que el animal generalmente no desencadena una respuesta extrema contra la asfixia; mas bien parece desencadenar respuestas asociadas con la administración de oxígeno en relación a lo que parecen ser buceos planificados (Kooyman,1985).

(*) La tasa de rutina se interpretó en peces como la tasa de actividad cuando todos los movimientos son aparentemente espontáneos; en los vertebrados terrestres se utiliza el término de tasa de transporte para designar a la tasa asociada con la locomoción normal mínima (paseo,vuelo) (Hoar,1978).

La regulación del conjunto de ajustes fisiológicos previos y/o durante el buceo voluntario lleva a un nuevo concepto : "respuesta al buceo" ("diving response") (Renouf,1991), en lugar de "reflejo de buceo", como fue citado antes.

Las respuestas fisiológicas, obtenidas en laboratorio, que se desencadenan durante el buceo son: **a-** bradicardia extrema, **b-** flujo sanguíneo restringido a algunos órganos, **c-** reducción del metabolismo aeróbico en muchos órganos, **d-** incremento significativo del metabolismo anaeróbico en algunos órganos, **e-** descenso de los niveles de oxígeno muscular, seguido por una acumulación de ácido láctico. Sin embargo, en lo que a ritmo cardíaco se refiere, parece existir una relación entre la duración del buceo (apnea) y la frecuencia cardíaca.

En la foca de Weddell existe poca o ninguna diferencia entre la tasa cardíaca en apneas durante el reposo y durante buceos de hasta 8 minutos (35-45 lat/min) (Kooyman y Campbell,1973). Cuando la foca excede los 10 minutos de buceo se reduce la tasa cardíaca, presentando un valor mínimo cuando el buceo se extiende mas allá de los 20 minutos (Kooyman,1985). Dependiendo de la actividad desarrollada durante el buceo, a partir de los 10 minutos aproximadamente comienzan a presentarse las respuestas obtenidas en el animal en condiciones forzadas.

Kooyman (1985,1989) plantea la existencia de un "buceo aeróbico límite" (BAL), estableciendo una correlación entre la duración del buceo y el nivel de ácido láctico que se genera durante el buceo.

Este límite marca la máxima apnea que es posible alcanzar sin que se produzca un incremento del ácido láctico durante o después de la inmersión. El BAL depende de: **1-** las reservas de oxígeno, **2-** el consumo de oxígeno, **3-** el grado de vasoconstricción periférica, y **4-** la tasa de producción y consumo de ácido láctico. El BAL parecería estar determinando tres tipos de buceos que se desencadenan durante las inmersiones voluntarias (Tabla 3).

Tabla 3: Tipos de buceos generales en relación al límite de buceo aeróbico (BAL) (Modificado de Kooyman, 1985).

BUCEOS CORTOS < 10 minutos	BUCEOS MEDIOS 10 minutos	BUCEOS LARGOS > 10 minutos
Dentro del BAL	Cercano o que apenas superan el BAL	Superan el BAL
El flujo sanguíneo se modifica según las condiciones del animal (por ej.: antes o después de alimentarse).		Se establece una respuesta extrema, similar a las desarrolladas en laboratorio.

La administración y utilización del oxígeno no es un mecanismo simple que se activa a "todo o nada" cuando el animal se sumerge. Un mamífero acuático puede alternativamente desarrollar cualquiera de los buceos mencionados, si bien cada especie presenta alguno preferencial, y cada uno de ellos desarrolla distintas variables gobernadas por centros nerviosos para preservar la homeostasis.

3.4 Estrategias generales de buceo: ¿nadadores o buceadores?

No todos los mamíferos acuáticos explotan de igual modo, los tiempos en superficie y los tiempos en inmersión.

Los estudios sobre comportamiento de buceo llevados a cabo en diversas especies demuestran que este grupo puede dividirse en : "buceadores" y "nadadores"(*). Esta diferenciación fue planteada por Kramer (1988), quien considera animales "buceadores"

(*) Esta palabra proviene de un término original en inglés: "surfacer". Su traducción no es muy precisa ("superficial"), por ello se decide para la presente Tesis adoptar un término mas adecuado: nadador

aquellas especies que sobre un período de 24 horas en el mar, pasan mas del 50% en la superficie, con períodos de buceo usualmente circadianos y en ciclos que pueden extenderse por horas.

Estos ciclos de buceos pueden ser descriptos como una serie de inmersiones, de profundidad típicas de cada especie, que se alternan con un corto intervalo en la superficie que no excede el 10 o 20 % del tiempo total del ciclo (Kooyman,1989). La duración de los buceos está determinada por el nivel de oxígeno almacenado y su tasa de consumo.

Los "nadadores" son aquellos animales que pasan la mayor parte del tiempo sumergidos, durante un lapso de 24 horas. y sólo emergen a la superficie durante cortos intervalos para llevar a cabo el intercambio de aire.

En este grupo, el buceo se presenta como continuo y no limitado a ciclos definidos de inmersiones. La mayor parte de los otáridos pertenecen al grupo buceador, en donde los buceos están definidos por ciclos de inmersiones poco profundas y duraderas, en relación a los buceos constantes de larga duración y profundidad que desarrollan los elefantes marinos (Le Boeuf y col.,1988; Campagna y col.,1995), típicos representantes del grupo nadador.

Pertenecer al grupo de los nadadores o de los buceadores probablemente este asociado a ajustes morfológicos y fisiológicos específicos. Surge de esto las siguientes incognitas: ¿como se desenvuelve en la interfase agua-aire un animal "nadador" adaptado en extremo a las profundidades?, y en el caso de los "buceadores", ¿como se desenvuelve en las profundidades un animal adaptado en extremo a la interfase?.

4. EL SISTEMA RESPIRATORIO EN PINNIPEDOS Y CETÁCEOS

4.1 Características anatómo-histológicas generales

Como fue mencionado en la Introducción general, el diseño del sistema respiratorio en los mamíferos marinos responde a dos necesidades fundamentales : **a)** ajustarse a los cambios de la presión externa, y **b)** facilitar el intercambio de importantes volúmenes de aire y en cortos intervalos de tiempo, respecto del patrón característico de los mamíferos terrestres.

Los mamíferos marinos presentan modificaciones desde la tráquea hasta la región alveolar. Sin embargo, no todos los representantes de este grupo adoptaron las mismas modificaciones estructurales.

La morfología pulmonar se puede dividir en dos partes. 1º) En lo que se refiere al patrón de lobulación, presenta en los cetáceos y en gran parte de los fócidos una modificación notable respecto de la mayoría de los mamíferos terrestres: ausencia de lobulillos pulmonares (Slijper,1962; Green,1972; Tarasoff y Kooyman,1973; Harrison y Fanning,1974), carácter que no se mantiene en los otáridos, que poseen lóbulos pulmonares típicos de otros mamíferos.

2º) En lo referente a la microanatomía pulmonar, los mamíferos marinos también se apartan del patrón clásico mamíferoide. En estos últimos, el pulmón por su estructura, semeja una glándula alveolar compuesta, en la que el estroma de sostén origina tabiques conectivos que dividen al pulmón en lobulillos de distinto orden.

El lobulillo de mayor tamaño es el secundario, abordado por una vía aérea denominada bronquio interlobulillar, incluido en el tejido conectivo del tabique de igual nombre. Esta vía una vez que penetró en el lobulillo secundario, recibirá el nombre de bronquiolo intralobulillar y por ramificación originará de 3 a 5 bronquiolos terminales que abordarán el lobulillo primario o acino, considerado la unidad anatómica y funcional del pulmón (Ham, 1981; Testut y Latarjet, 1979; Weiss, 1983).

Los estudios de la microanatomía pulmonar de los mamíferos marinos no arrojan ninguna precisión respecto a la división del pulmón en lobulillos de distinto orden.

Existen solamente dos trabajos realizados en la foca de Weddell (Boyd, 1975; De Carlo y col., 1976) donde los autores abordan este tema, no acordando al respecto de la existencia y nomenclatura referida a los lobulillos primarios y secundarios.

Las vías aéreas extrapulmonares se diferencian en los distintos grupos de mamíferos marinos en número y longitud relativa. Los cetáceos presentan en general una corta tráquea (Slijper, 1962), y los bronquios primarios varían en longitud y en el patrón de ramificación. En los pinnípedos, los bronquios primarios o extrapulmonares desarrollan un patrón de ramificación distinto en los dos grupos principales. En los fócidos se observa una larga tráquea, y los bronquios primarios emergen en las proximidades del hilio pulmonar; en cambio en los otáridos, la ramificación traqueal es mas temprana, originando bronquios primarios de considerable longitud (King, 1974; Tarasoff y Kooyman, 1983).

El patrón de ramificación del árbol bronquial, también presenta modificaciones en los distintos grupos. En la mayoría de los cetáceos se desarrolla un patrón de ramificación asimétrico, que promueve la aparición de bronquiolos terminales en generaciones tempranas de las vías aéreas (Tarasoff y Kocyman, 1973).

En los pocos otáridos estudiados hasta el presente, se desarrolla un patrón de ramificación mas regular, presentando así mayor similitud con la mayoría de los mamíferos terrestres (Nakakuki, 1993); a diferencia, en los fócidos parece desarrollarse un patrón intermedio entre los dos grupos mencionados.

La histología general de las vías aéreas, de los mamíferos marinos difiere en pocos aspectos de la de los mamíferos terrestres. Probablemente estos aspectos divergentes reflejen ajustes microanatómicos del sistema a la actividad subacuática.

En los pinnípedos, los principales estudios se concentraron en la descripción histológica del sistema respiratorio de la foca de Weddell, *Leptonychotes weddelli* (Boshier y Hill, 1974; Boyd, 1975; De Carlo y col., 1976). Se describió la constitución histológica de las vías aéreas extrapulmonares e intrapulmonares, no habiendo unanimidad de criterios fundamentalmente en la interpretación histológica de las glándulas asociadas a la mucosa respiratoria (Boyd, 1975; De Carlo y col., 1976). Hasta el momento no se ha realizado un estudio detallado de la histología de las vías aéreas de un Otárido.

En los cetáceos, el delfín nariz de botella o tonina (*Tursiops truncatus*), fue la especie mejor descrita histológicamente (Wislocki,1929; Fanning y Harrison,1974). Una de las principales diferencias histológicas de las vías aéreas con respecto a las de otros mamíferos, es la ausencia de glándulas en las vías aéreas intrapulmonares (Harrison y Fanning,1974). En la ballena azul (*Balaena mysticetus*), el número de glándulas mucosas decrecen hasta desaparecer en las vías intrapulmonares menores de 3 mm de diámetro (Henk y Haldiman,1990).

En la mayoría de los cetáceos y pinnípedos, el cartílago se distribuye a largo de todas las vías aéreas intrapulmonares a modo de anillos incompletos y placas aisladas.

4.2 Vías aéreas terminales: una región altamente especializada

La región terminal del árbol bronquial de los mamíferos marinos presenta notables diferencias en relación con los mamíferos terrestres. En promedio, a partir de vías de 0,5 mm. de diámetro y menores, se observan estructuras que parecen estar asociadas a los buceos profundos, a las apneas prolongadas, y al rápido intercambio de aire en la superficie (Simpson y Gardner,1972). Las estructuras mencionadas son:

- 1) Placas de cartílago
- 2) Esfínteres mioelásticos

Los bronquiolos terminales de los mamíferos carnívoros terrestres, incluyendo algunas formas emparentadas con los mamíferos acuáticos, no presentan placas de cartílago en la túnica fibroelástica.

Lo mismo ocurre en algunos mamíferos terrestres con una moderada actividad acuática, como por ejemplo: el hipopótamo, el coipo y la nutria de río (Denison y Kooyman,1973).

Sin embargo, aunque los mamíferos marinos representan un grupo de animales con amplia diversidad, la presencia de cartílago en las vías terminales es un factor común a todas las especies.

La adquisición de cartílago terminal por parte de los pinnípedos, cetáceos y sirénidos representa un sorprendente ejemplo de convergencia evolutiva (Denison y Kooyman, 1973).

En general, los fócidos desarrollan una vía aérea terminal menos modificada; la porción más distal del bronquiolo no presenta cartílago; desemboca en un bronquiolo respiratorio que finalmente termina en un ducto alveolar. Las porciones libres de cartílago presentan un elevado reforzamiento de músculo liso (Denison y Kooyman, 1973; Boyd, 1975). En los otáridos, los bronquiolos terminales de las especies estudiadas presentan un refuerzo cartilaginoso hasta la desembocadura en los sacos alveolares. Esto mismo ocurre en los cetáceos, aunque en algunos representantes de este grupo a la presencia de cartílago se suma la de los esfínteres mioelásticos (Goudappel y Slijper, 1958; Kooyman, 1973; Denison y Kooyman, 1973) (Figura 1). Un desarrollo intermedio del cartílago terminal entre fócidos por un lado, y otáridos y cetáceos por el otro aparece en las morsas y nutrias marinas.

Los esfínteres mioelásticos no están presentes en todos los cetáceos; en las especies estudiadas hasta el momento, su presencia se concentra en los delfines y marsopas. Los grandes cetáceos no poseen esfínteres; sin embargo estas especies (ballenas, cachalotes) presentan gruesos haces mioelásticos longitudinales en ductos alveolares (Simpson y Gardner, 1972).

La mucosa de los bronquiolos terminales de los pequeños cetáceos puede tener entre 8 y 40 anillos mioelásticos consecutivos. Estos esfínteres dividen al lumen de la vía en numerosas cámaras (Goudappel y Slijper, 1958).

Algunos autores se refirieron a estos esfínteres mioelásticos como válvulas, asignando a la vía el nombre de bronquiolo segmentado o segmento valvular (Lacoste y Baudrimont, 1926; Wislocki, 1929; Belanger, 1940).

4.3 Parénquima alveolar: ¿Una región altamente especializada?

Una región pulmonar que merece también una descripción anatómica e histológica particular es el parénquima alveolar. Esta región presenta variaciones, en las pocas especies de mamíferos acuáticos estudiadas, en lo referido a la arquitectura general del lobulillo pulmonar, a la morfometría alveolar y a la vascularización de los alvéolos

(Belanger,1940; Wislocki y Belanger,1940; Simpson y Gardner,1972; Denison y Kooyman,1973; Boyd,1975; De Carlo y col.,1976).

En los pequeños cetáceos, como la tonina, el bronquiolo terminal puede dar origen a ductos alveolares, sacos alveolares, y en algunas regiones dar a alvéolos directamente (Simpson y Gardner,1972; Harrison y Fanning,1974).

Las paredes de los ductos alveolares están formadas por el epitelio de revestimiento y por una red fibroelástica que se continua en las paredes alveolares. Los pequeños cetáceos descritos por Belanger (1940), la tonina y la beluga (*Delphinapterus leucas*), presentan luego del segmento valvular (o segmento con esfínteres), una apertura abrupta a un segmento terminal dilatado, que representa el saco respiratorio.

La composición celular principal de los alvéolos en *T.truncatus*, no difiere de lo observado en los mamíferos terrestres. Los alvéolos están tapizados por un epitelio simple escamoso o células tipo I. Alternando con ellas, se encuentran las células alveolares grandes o tipo II, que serían las encargadas de secretar sustancias tensioactivas o surfactantes (Harrison y Fanning,1974).

El diámetro alveolar promedio es de 0,1 - 0,4 mm., y el grosor del tabique alveolar oscila entre 10 - 20 μ m (Belanger,1940; Simpson y Gardner,1972).

En los grandes cetáceos (*Megaptera nodosa*, *Balaenoptera sibbaldii*, *Balaenoptera physalis*), el bronquiolo terminal generalmente desemboca abruptamente en los sacos aéreos. De las fibras musculares que rodean al bronquiolo, emergen otras que rodean la primera porción del saco aéreo (Belanger,1940).

El saco alveolar es mayor en este grupo, pero el tamaño alveolar es similar al de los pequeños cetáceos. El grosor del tabique alveolar asciende a 30 - 50 μ m, con gran abundancia de tejido elástico (Simpson y Gardner,1972).

Tanto para grandes cetáceos como para pequeños cetáceos y sirénidos, la pared que separa un saco aéreo del otro varia en su grosor en relación a la ubicación dentro del pulmón. Wislocki y Belanger (1940), describieron que el grosor que separa dos sacos adyacentes oscila entre 20 - 240 μ m, lo que significa un grosor cinco veces mayor que en el pulmón humano. Pero no surge de la bibliografía datos que permitan establecer una correlación entre el grosor del tabique alveolar y el lecho capilar simple o doble.

En los pinnípedos estudiados, también se presentan diferencias entre los grupos existentes. Los fócidos presentan alvéolos de 50 - 150 μm de diámetro, y con una pared alveolar de 5 - 10 μm de grosor. Luego de un corto bronquiolo respiratorio puede emerger uno o dos sacos alveolares, con un largo promedio de 700 μm (Denison y Kooyman, 1973). Boyd (1975) y De Carlo y col. (1976) describieron la presencia de ductos alveolares en la foca de Weddell.

Los otáridos presentan alvéolos de unos 200 μm de diámetro promedio, y con un tabique alveolar de unos 5 - 10 μm de grosor. Luego del bronquiolo terminal completamente reforzado por cartílago, los sacos alveolares emergen de a pares con un largo promedio de 500 μm (Denison y Kooyman, 1973).

La estructura citológica de esta región fue descrita principalmente en una especie de fócido: la foca de Weddell, y no varía con respecto a otros mamíferos terrestres. Se observaron células tipo I o escamosas, células tipo II o alveolares grandes, y macrófagos (Boshier y Hill, 1974; Boyd, 1975). Tanto fócidos como otáridos presentan un solo lecho capilar en las paredes alveolares (Simpson y Gardner, 1972).

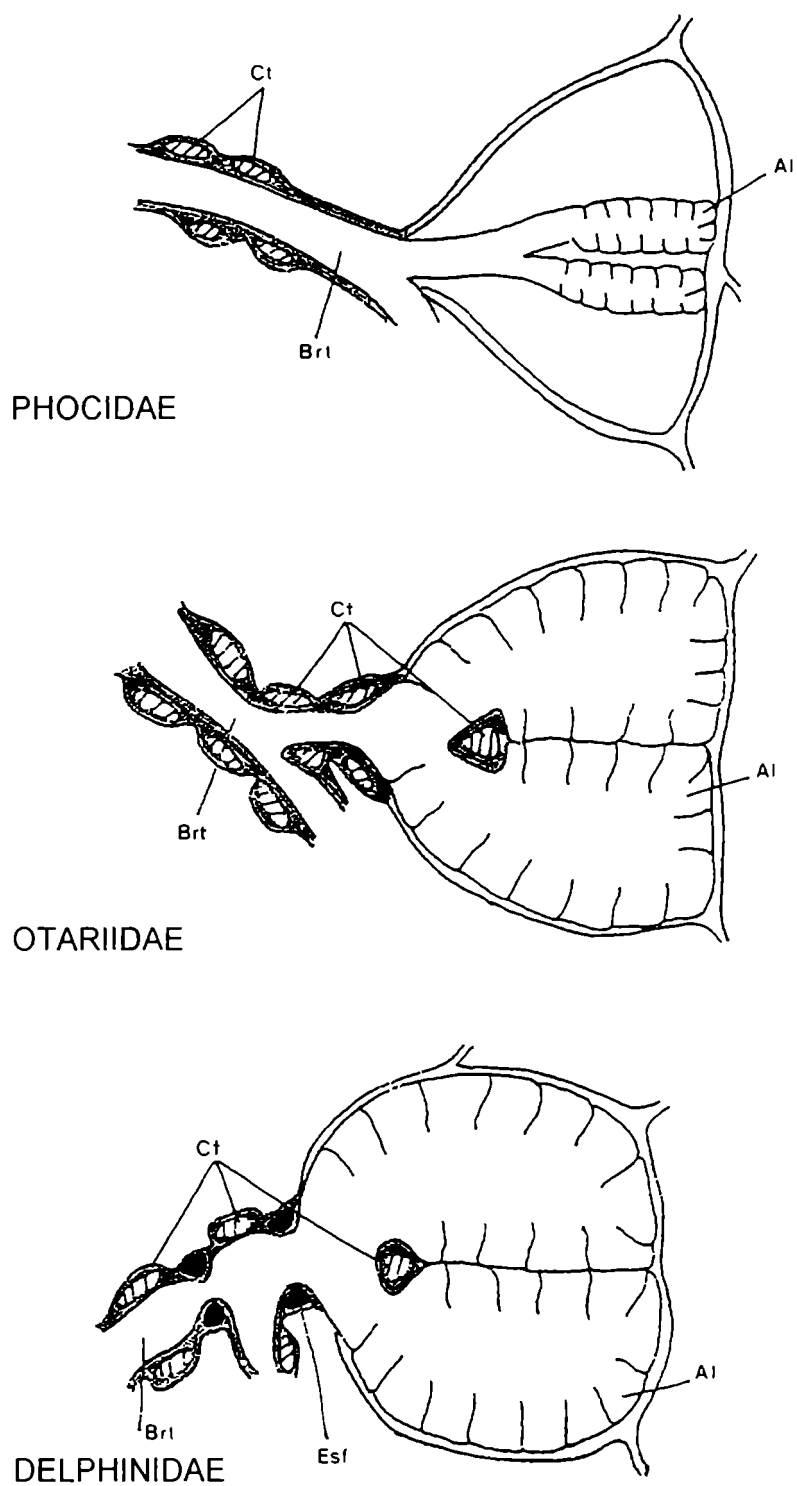


Figura 1: Esquemas de la región bronquial terminal y su desembocadura a la región alveolar en otáridos, fócidos y delfines. Al: alveólo, Brt: bronquiolo terminal, Ct: cartílago, Esf: esfínter.

OBJETIVOS DE LA TESIS

5. OBJETIVOS DE LA TESIS

El sistema respiratorio de los pinnípedos y de los cetáceos, respeta una arquitectura general homogénea en todos los representantes de los dos grupos, pero como miembros del grupo de mamíferos acuáticos expresan algunos rasgos anatomo-histológicos únicos: **presencia de cartílago y de esfínteres mioelásticos en las vías aéreas terminales**. Estas estructuras sobresalientes no son uniformes en todas las especies, lo cual sugiere que los distintos mamíferos acuáticos han explotado diferencialmente estas adquisiciones evolutivas.

La presencia de cartílago y esfínteres mioelásticos en las vías terminales del sistema respiratorio de los mamíferos marinos permite preguntarse si existen o no otro tipo de modificaciones morfológicas que completen el plan de reorganización del sistema respiratorio. La respuesta es afirmativa, como por ejemplo la ausencia de lobulación pulmonar y la presencia de árboles traqueobronquiales con una ramificación particular. Al parecer, el sistema respiratorio de los mamíferos marinos presenta variaciones anatomo-histológicas que les son propias, mientras que otras, están también presentes en otros grupos de mamíferos.

La mayoría de los estudios morfológicos del sistema respiratorio en estos animales se desarrollaron bajo dos tendencias generales: estudios generales en una sola especie, y trabajos en los que se realiza el estudio comparado en algunas especies de una característica estructural particular.

Debido a esto último, el **objetivo general** de la presente Tesis es llevar a cabo un **estudio comparado de la anatomía e histología del árbol traqueobronquial y del parénquima pulmonar en seis especies de mamíferos acuáticos**.

Dentro de este objetivo general se plantea poner a prueba las siguientes hipótesis:

a) Los pinnípedos y los cetáceos presentan arquitecturas particulares en el sistema respiratorio, pudiendo existir características estructurales comunes que superan las barreras taxonómicas.

b) Algunas características estructurales comunes se pueden asociar con hábitos de buceos similares.

Para llevar a cabo el análisis de estas hipótesis, se subdividió este estudio en tres partes. La primera parte tiene como objetivo describir la macro y microanatomía del árbol traqueobronquial y parénquima pulmonar en especies de mamíferos marinos de nuestras costas pertenecientes a los Ordenes Pinnipedia y Cetacea, con el fin de establecer comparaciones puntuales entre ellas y con otras especies.

La segunda parte tiene como objetivo el estudio de las dos características más sobresalientes del sistema respiratorio de los mamíferos acuáticos: el cartílago y los esfínteres mioelásticos de las vías aéreas terminales, desde un enfoque estructural en relación con las implicancias funcionales.

La tercera parte tiene como objetivo estudiar la morfometría alveolar en cinco especies de mamíferos acuáticos, para poder establecer si existe algún tipo de relación entre el área de hematosis, el consumo de oxígeno y los hábitos de buceo.

MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de las muestras estudiadas

El presente estudio fue posible a partir de la obtención de sistemas respiratorios de animales provenientes de diferentes lugares de las costas Argentinas y Uruguayas. Estas muestras se obtuvieron por captura incidental como fue el caso de los cetáceos, mortalidad natural especialmente en el caso de los cachorros de pinnípedos, y zafra comercial en la mayor parte de los pinnípedos adultos.

A continuación se detallan el año, lugar, duración, y tipo de muestreo realizado.

- 1987. Isla de lobos (Uruguay), 7 días. Obtención de piezas de sistemas respiratorios de *A.australis* adultos.
- 1988. Isla de Lobos (Uruguay), 7 días. Obtención de piezas de sistemas respiratorios de *A.australis* y *O.flavescens* adultos.
- 1989. Quequen (Argentina), 5 días. Obtención de piezas de sistemas respiratorios de *P.blainvillei*, *L.obscurus*, *P.spinipinnis*, y *D.delphis* adultos.
- 1990. Punta Norte (Chubut,Argentina), 45 días. Obtención de piezas de sistemas respiratorios de cachorros de *O.flavescens*.
- 1990. Cabo Polonio (Uruguay), 7 días. Obtención de piezas de sistemas respiratorios de *A.australis*.
- 1991. Isla de Lobos (Uruguay), 7 días. Obtención de piezas de sistemas respiratorios de *A.australis* y *O.flavescens*.
- 1992. Punta Norte (Chubut,Argentina), 35 días. Obtención de piezas de sistemas respiratorios de cachorros de *O.flavescens*.

6.2 Tipo de muestreo

6.2.1 Obtención de sistemas respiratorios de adultos de *O.flavescens* y *A.australis*

Las muestras de ejemplares adultos de *A.australis* y *O.flavescens* proviene de material no procesado en las zafras comerciales que se llevaron a cabo en el Uruguay (Isla de Lobos y Cabo Polonio) bajo el control de la Industria Lobera y Pesquera del Estado (ILPE). Este material pudo fijarse pocos minutos después de la muerte del animal, lo que facilitó la realización de estudios histológicos y citológicos.

6.2.2 Obtención de sistemas respiratorios de adultos de *P.blainvillei*, *L.obscurus*, *P.spinipinnis*, y *D.delphis*

Los sistemas respiratorios de los ejemplares adultos de los delfines estudiados: *P.blainvillei*, *L.obscurus*, *P.spinipinnis*, y *D.delphis*, provienen de muestreos llevados a cabo en las costas de la Provincia de Buenos Aires. Los ejemplares fueron capturados incidentalmente por la pesquería de arrastre de la anchoita y el tiburón. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en un laboratorio perteneciente a la Estación Hidrobiológica de Puerto Quequen, perteneciente al Museo Argentino de Cs. Naturales "B. Rivadavia" (Figura 1).

El tipo de captura de los ejemplares, condicionó un muestreo heterogéneo, no solo en lo cuantitativo sino también en lo referido a la calidad de la muestras biológicas, dado el tiempo transcurrido entre la muerte del animal y el momento en que fue posible fijarla. Esto ultimó planteó la necesidad de concentrar el estudio histológico en *P.blainvillei* dado que esta especie presentó la mayor mortalidad en redes y por lo tanto se pudo seleccionar aquellos sistemas respiratorios que no mostraron alteraciones morfológicas post-mortem muy marcadas.

6.2.3 Obtención de sistemas respiratorios de cachorros de *O.flavescens*

Se realizaron dos campañas dirigidas por el Dr. Claudio Campagna con el objeto de estudiar el comportamiento reproductivo y aspectos ecológicos en *O.flavescens*. Como parte de estos estudios marcamos aquellas crías cuyo momento de nacimiento era conocido, para ello se realizó previamente la marcación con pintura acrílica de distintos colores en diferentes regiones del cuerpo de las hembras que llegaban preñadas a la

agrupación reproductiva (Figura 2). Durante la primer captura de la cría, cuyo momento de nacimiento se tenía determinado, se procedía a su marcación mediante dos métodos:

- a) caravanas plásticas en la parte interna de la aleta anterior,
- b) tintura para cabello con la cual se realizaba marcas en el dorso y en la cabeza.

Aquellos cachorros que murieron por causas naturales (abandono de la madre, inanición, infanticidio) se sometieron a necropsia y sus pulmones se procesaron inmediatamente para realizar los estudios histológicos (Figura 3).

Debido a la marcación previa de cada cachorro, su edad era conocida con exactitud, sin embargo no todas las muestras obtenidas pudieron utilizarse para el estudio histológico, dado que muchas veces el tiempo transcurrido entre la muerte del animal y su hallazgo fue lo suficientemente prolongado para que los preparados histológicos fueran exitosos.

6.3 Número de ejemplares procesados

El número de ejemplares correspondientes a las distintas especies incluidas en esta Tesis es variable y como fue mencionado anteriormente, esto dependió del tipo de muestreo al que se pudo acceder.

A continuación se presenta el número total de ejemplares por especie que pudo ser procesado para la obtención del sistema respiratorio completo y/o muestras parciales que se consideraron exitosas para el estudio histológico:

- *A. australis*: 14 ejemplares adultos.
- *O. flavescens*: 2 ejemplares adultos, 22 ejemplares cachorros.
- *P. blainvillei*: 6 ejemplares adultos.
- *P. spinipinnis*: 2 ejemplares adultos.
- *L. obscurus*: 1 ejemplar adulto.
- *D. delphis*: 1 ejemplar adulto.

La mayor parte de las muestras biológicas obtenidas, debieron descartarse, porque el estado necrótico impidió un estudio satisfactorio.

6.4 Análisis anatómico

6.4.1 Vías aéreas extrapulmonares

Se utilizaron las vías aéreas extrapulmonares (tráquea y bronquios primarios) de los sistemas respiratorios de cinco ejemplares de la especie *A.australis*, tres de *P.blainvillei*, uno de *L.obscurus*, y uno de *D.delphis*.

Los diámetros y largos de la tráquea y bronquios extrapulmonares, se registraron previamente a la fijación. Los diámetros se tomaron en la región media de cada vía, y los largos desde el nacimiento de la vía hasta su punto de ramificación (Figura 4), (Phalen y Oldham, 1983).

Las medidas de los diámetros se realizaron con un calibre de precisión, y las longitudes con una cinta métrica metálica.

6.4.2 Pulmón

Se realizó, a campo, el estudio de la morfología pulmonar de cada especie identificando la presencia o no de lóbulos pulmonares y tomando las medidas del eje longitudinal mayor y del perpendicular mayor correspondiente, en cada lóbulo o pulmón unilobular, según el caso. Los pulmones fueron luego seccionados, extrayéndose muestras que transportadas al laboratorio, se utilizaron para otros estudios.

6.4.2.1 Vías aéreas intrapulmonares mayores

El estudio anatómico de los patrones de ramificación y de la relación existente entre las vías aéreas de las sucesivas generaciones se llevaron a cabo con la siguiente metodología. Se colocó una cánula en la vía bronquial aferente del pulmón (en los pulmones unilobulados) o en la vía bronquial lobular (en un lóbulo de los pulmones lobulados) con una guía metálica flexible de 0,2 mm de sección, teniendo cuidado de no perforar los conductos. Mediante el uso de hojas de bisturí de distintas longitudes, según correspondiera, se seccionó el pulmón según el plano sagital de la vía aérea principal

canulizada. Se cuidó de incorporar, en el plano de corte, la mayor cantidad posible de ramificaciones laterales (Plopper y col., 1983), siguiéndolas cuidadosamente, para así poder determinar la relación entre la rama parental y las ramas hijas. Mediante esta técnica se pudo determinar el **patrón de ramificación bronquial**. Dado que el plano de corte excluyó ramificaciones emergentes en otros planos, el patrón tridimensional real se determinó mediante el estudio de placas radiográficas, obtenidas previa perfusión por tráquea de una sustancia radiopaca (Bariodif polvo citratado), utilizando un aparato de rayos X, marca Siemens (Ergophas 4, 500 mA, 125 KUP), y la técnica aplicada fue de 10 m/seg.-50 Kv.

Mediante el uso de calibre se midieron los diámetros de las vías menores y de la parental en cada generación en las preparaciones seccionadas según la descripción precedente.

El **área de la sección** de cada vía en las distintas generaciones se calculó aplicando la siguiente ecuación: $A = \pi \cdot r^2$ (donde A es el área de sección y r es el radio) (Drabek y Kooyman, 1983).

En las mediciones llevadas a cabo en las vías aéreas intrapulmonares mayores se estableció el **factor de relación de los diámetros** (Frd). Este factor se calculó en base al cociente entre el diámetro de la vía parental (D_1) y la sumatoria de los diámetros de las vías hijas ($D_2 + D_3$), o sea $Frd = D_1 / D_2 + D_3$.

También se calculó el cociente entre los diámetros de las vías hermanas (descendientes de un misma vía parental), luego de una ramificación dicotómica. Este cociente se obtuvo al dividir el diámetro de la vía hija mayor (D_2) por el diámetro de la vía hija menor (D_3).

6.4.2.2 Vías aéreas intrapulmonares menores

Para el estudio de la anatomía de las vías aéreas menores se ensayaron diversas metodologías, obteniéndose los mejores resultados con la confección de **a) moldes de resina y b) cortes seriados**.

a) Estudio mediante moldes de resina

Se seccionaron distintas regiones periféricas del pulmón de un volumen aproximado de 2 cm³. Esto se estableció "a priori" para asegurar la existencia de vías terminales en la zona seleccionada. Se aseguró también que las piezas extraídas tuvieran la mayor parte de su superficie cubierta por pleura, para evitar la pérdida de resina por los laterales o por la base de la muestra.

Previo a la perfusión con la resina, se suspendió a la pieza de manera que quedara colgando de unos hilos ligados al aro de un trípode metálico, situando a la pieza en el centro. De esta forma se evitó cualquier contacto físico con la pieza.

La mezcla de resina utilizada estuvo constituida por : a) Resina Nobile 110 (20 ml), b) diluyente Nobile (2 ml), y c) catalizador Nobile (8 gotas).

Inicialmente se mezcló la resina y el diluyente en un vaso de precipitados, y luego de mezclar bien con una varilla de vidrio, se agregó el catalizador. La mezcla obtenida se perfundió con una jeringa de 5 ml en la vía seleccionada en una de las caras de la pieza, correspondiente a una vía terminal no menor a 2 mm de diámetro. Finalmente, se inyectó la resina a intervalos para facilitar el ingreso gradual de la mezcla. Se detuvo la perfusión cuando la mezcla se estacionó en el borde superior de la vía de ingreso.

Se dejó la pieza a temperatura ambiente y en la misma posición en la que se efectuó la perfusión, conjuntamente con una muestra de la resina en una cápsula de petri como control, para determinar el tiempo de fraguado. Una vez solidificada la muestra control, se dejó la pieza perfundida otras 48 horas, para asegurar el fraguado completo de la resina en su interior.

La dilaceración del tejido pulmonar se llevó a cabo al sumergir la pieza en KOH 10 %. Se controló a diario, y con la ayuda de una aguja de disección se removieron los restos de tejido pulmonar hasta obtener el molde de resina libre de materia orgánica del árbol bronquial terminal.

b) Estudios mediante cortes seriados**b1) Vías aéreas terminales**

Se procesaron histológicamente trozos de pulmón próximos a la superficie, con el objeto de asegurar la existencia de vías aéreas terminales, hasta obtener cortes seriados de 15 μm de espesor. Otros bloques procesados correspondieron a zonas subterminales con el objeto de observar las vías aéreas intermedias. En ambos casos, el número total de cortes superó el número de 100.

Se colorearon con hematoxilina - eosina o tricrómico de Masson y se analizaron bajo lupa binocular estereoscópica Wild con cámara clara, obteniendo de esta manera los dibujos de los contornos de las vías, para poder efectuar la reconstrucción tridimensional.

La reconstrucción se facilitó por la inyección de tinta negra en una vía aérea elegida al azar, lo que facilitó su identificación y la de sus vías emergentes a través de los cortes sucesivos.

b2) Glándulas de la mucosa traqueobronquial

Dado la complejidad arquitectónica de las glándulas de la mucosa traqueobronquial observada en los primeros estudios topográficos, se procedió en forma análoga a **b1** pero incluyendo en parafina, trozos de la mucosa de estas vías y seccionando los tacos en forma seriada a un grosor menor de 8 μm . La reconstrucción se realizó mediante un análisis de cada corte al microscopio óptico.

6.5 Análisis histológico**6.5.1 Técnicas histológicas para microscopía óptica**

Los sistemas respiratorios completos se fijaron en formol neutro 10% en buffer fosfato, por inmersión, previa perfusión de dicho fijador por vía traqueal. En algunos casos se seleccionaron distintas zonas de estos sistemas, obteniéndose bloques (1,5 cm^3) que se fijaron en las mezclas fijadoras de Bouin y Zenker (Bancroft y Stevens, 1990).

Los trozos de distintas partes del sistema respiratorio, ya fueran vías aéreas extrapulmonares o pulmón, se transportaron al laboratorio inmersas en formol, y se postfijaron en bicromato de potasio al 0,25% con el fin de resaltar las estructuras celulares de membrana.

El material seleccionado para estudios microanatómicos se deshidrató, diafanizó e incluyó en parafina de punto de fusión 56°-58°c.

Se obtuvieron cortes de 4 a 8 μm de espesor con micrótopo de deslizamiento. Otras piezas del material fijado en formol se cortaron con crióstato, para posteriores estudios histoquímicos.

6.5.1.1 Técnicas histológicas topográficas

Con el fin de determinar la estructura histológica del parénquima pulmonar y de todas las vías aéreas extrapulmonares e intrapulmonares, se realizaron:

a) Cortes seriados de 5 μm de las piezas incluidas en parafina, las que se colorearon (Bancroft y Stevens, 1990; Pearse, 1985) con:

- 1- Hematoxilina de Carazzi o de Meyer y eosina alcohólica 1% en alcohol 70%.
- 2- Tricómico de Masson, reemplazando la coloración nuclear por hematoxilina de Carazzi.
- 3- Coloración de Mallory (Azan) Heidenhain

b) Secciones de 1 μm incluidas en resinas para microscopía electrónica se colorearon con azul de toluidina - bórax (Bancroft y Stevens, 1990).

6.5.1.2 Técnicas histoquímicas

Como consecuencia de los estudios microanatómicos surgió la necesidad de identificar estructuras tisulares y celulares específicas y la secreción de las glándulas de la mucosa de las vías aéreas extrapulmonares e intrapulmonares mayores.

Esta parte del estudio histológico e histoquímico se llevó a cabo en las dos especies de pinnípedos debido a que lamentablemente el tipo de muestreo desarrollado en los cetáceos, impidió efectuar una correcta evaluación histoquímica de los especímenes procesados.

El estudio histoquímico se aplicó a la determinación de glicanos, proteínas y lípidos.

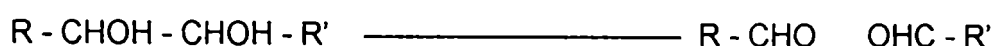
La clasificación de los **carbohidratos** o **glicanos** ha sufrido cambios considerables en las últimas dos décadas por haberse logrado una mayor comprensión de la forma en que son sintetizados por la célula, y por conocer los distintos compuestos que son capaces de formar a partir de su unión a otras moléculas.

Según Spicer (1992), los hidratos de carbono, además de encontrarse formados exclusivamente por azúcares, como es el caso de los polisacáridos u oligosacáridos (glicógeno, almidón, etc) pueden aminorarse y/o unirse a proteínas o lípidos. En el primer caso, estarían comprendidos los glicosaminoglicanos (GAG). La unión de glicanos a proteínas o lípidos darían compuestos colectivamente denominados **glicoconjugados**. Dentro de éstos se pueden distinguir los **proteoglicanos**, formados por GAG unidos a un polipéptido por un puente débil, las **glicoproteínas** constituidas por la unión de azúcares a una molécula proteica por enlaces fuertes (de tipo covalente), y los **glicolípidos** formados por azúcares y lípidos. Estos glicoconjugados, presentan a su vez la posibilidad de acidificarse mediante la sulfatación o sialatación.

Paralelamente con el conocimiento de la estructura de los azúcares, progresó la histoquímica para diferenciarlos. Las técnicas empleadas en la presente Tesis fueron:

a) **PAS**, según McManus con el reactivo de Schiff según formula de Tomasi (Pearse, 1985).

Este método permite distinguir **polisacáridos** y **glicoproteínas** cuyas hexosas poseen grupos 1 - 2 glicol oxidables a aldehidos. Esta oxidación es llevada a cabo por el ácido periódico (IO_4H),



En las condiciones de trabajo descritas por Mc Manus (1947) en Pearse (1985), la oxidación no progresa hasta ácido, por lo tanto el reactivo de Schiff en estado de leucobase, se colorea de fucsia en presencia de los grupos aldehído. La reacción da negativo cuando los grupos glicol están bloqueados por radicales $-SO_3H$.

b) Método de oxidación selectiva del ácido siálico de glicanos sialatados [OHK - PA*S]

Los reactivos ácido periódico y Schiff pueden emplearse para la identificación del ácido siálico en los glicanos. La capacidad identificatoria de esta reacción, se basa en que la oxidación del triol exocíclico de los residuos de ácido siálico es mucho más rápida que el de los dioles vecinos ubicados en los azúcares neutros. De tal manera, el empleo de ácido periódico de baja molaridad y las bajas temperaturas en la reacción pueden llevar a la oxidación completa de los residuos de ácido siálico solamente, poniéndolos luego en evidencia con el reactivo de Schiff (Volz y col.,1987). Sin embargo, el ácido siálico suele presentar los carbonos 7, 8 y 9 acetilados lo que negativiza la reacción de PAS. La saponificación con hidróxido de potasio desacetila lo que permite luego evidenciar mediante el PAS modificado (PA*) por Volz (1987) la presencia de dicho ácido. Por lo tanto la secuencia: OHK (hidróxido de potasio 0,5% p/v en etanol 70 %; 15 minutos) ; PA* (ácido periódico 0,4 mM en ClH 1 M a 4°C;60 minutos) ; y el [HOK-PA*-S], permite distinguir ácido siálico, unido o no a glicanos.

La corroboración de la unión del ácido siálico a azúcares neutros, está dada por la secuencia de reacción [OHK - PA* - Bh - PAS] según la cual se efectúa la saponificación con hidróxido de potasio(OHK) ; PA* ; reducción con borohidruro de sodio (Bh) de grupos aldehídos generados por la oxidación PA* y formados en el ácido siálico (Lillie y Peyyolato,1972). Estos grupos aldehído reducidos se convierten en no reactivos al Schiff ; PAS (según Mc Manus). La positividad de PAS estará dada solamente por los azúcares neutros.

c) Método de azul alcian para detección de glicoconjugados sulfatados y carboxilados.

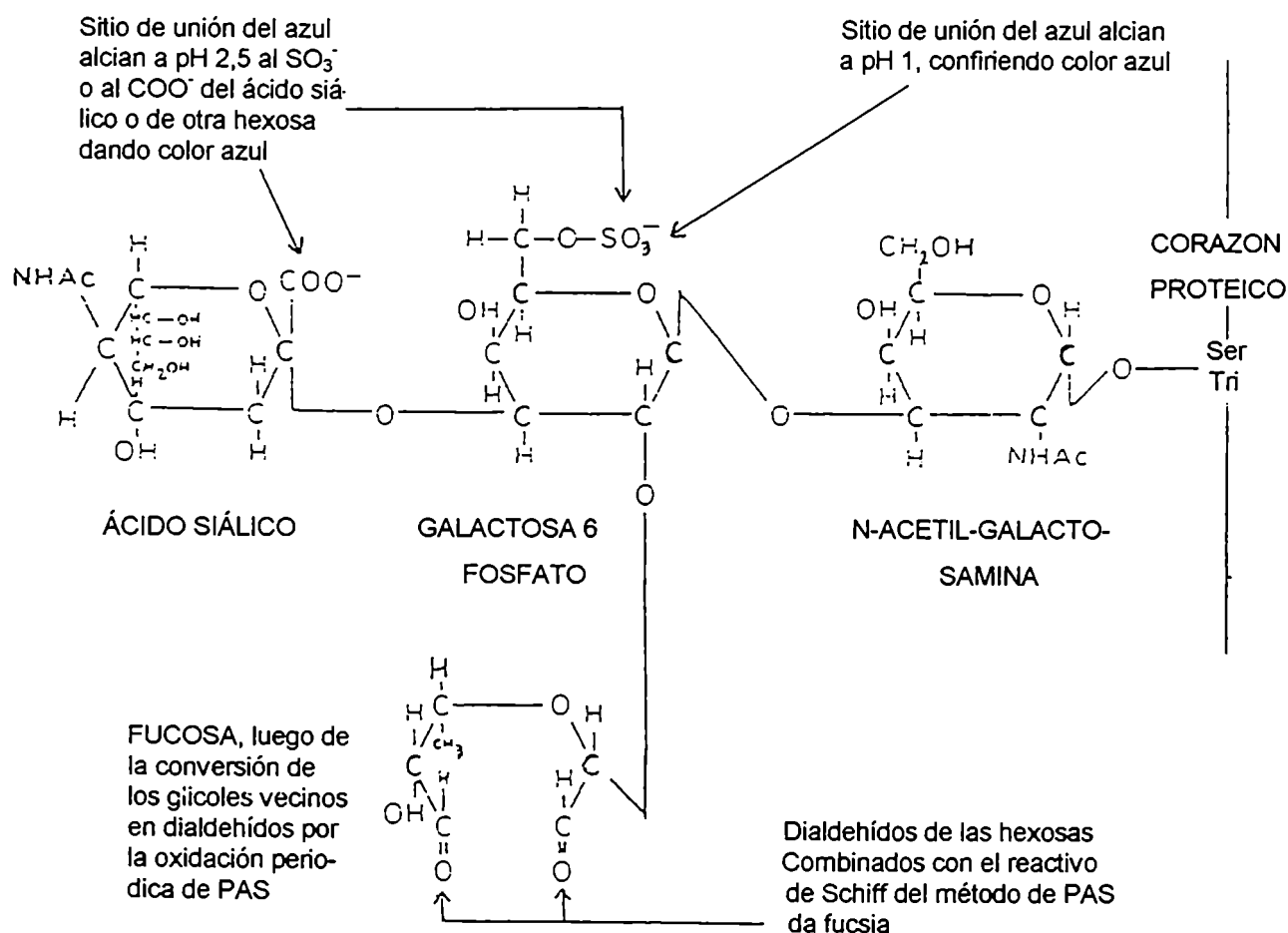
El azul alcian es un colorante catiónico que tiñe con diferente intensidad, según el número de cargas (-) expuestas por el tejido. El número de cargas es función del pH al que se

encuentra dicho tejido. A pH 2,5 los ésteres sulfato y carboxilo se encuentran ionizados y se unen al azul alcian, mientras que a pH 0,5, sólo los sulfato, fuertemente ácidos, ofrecen sitio de unión al colorante (Bancroft y Stevens, 1990).

d) Método de Mowry (técnica combinada de azul alcian [pH 2,5] y PAS)

Con esta técnica quedan claramente separados los glicanos ácidos y neutros. Inicialmente el azul alcian identifica los glicanos ácidos de color azul, y el tratamiento posterior con PAS solo pone de manifiesto los glicanos neutros de color fucsia (Bancroft y Stevens, 1990)

Resumen de tinciones histoquímicas selectivas para detección de glicoproteínas (*)



(*) Modificado de Spicer y col., 1983.

e) Técnica de mercurio y azul de bromofenol.

Se emplea para la demostración de proteínas pero según Pearse (1985) su mecanismo de coloración no es de tipo histoquímico. El colorante es dicromático ya que varía su tonalidad con la concentración, dando color rojo a elevadas concentraciones proteicas y azul claro a gris a bajas concentraciones.

f) Técnica de sulfato de azul de Nilo (Método de Cain)

Se emplea para la demostración de lípidos, dando como resultado una coloración rosa para lípidos insaturados hidrofóbicos, rosa a azul para ácidos grasos libres y azul para fosfolípidos (Pearse, 1985; Bancroft y Stevens, 1990).

g) Técnica de Sudan III

Para la detección de lípidos se utilizaron cortes histológicos obtenidos al crióstato de piezas sin previa fijación o fijadas en formol buffer fosfato 10%, y fueron coloreados con Sudan III (Pearse, 1985)

h) Técnica de Orceina nítrica (Rubens Duval)

Finalmente, para la detección de fibras elásticas se utilizó la técnica de Orceina nítrica de Rubens Duval (Pearse, 1985). En rigor no es una técnica histoquímica, pero permite distinguir selectivamente las fibras elásticas, que en medio alcohólico adquieren afinidad por la orceina.

6.5.2 Técnicas para microscopía electrónica

Se obtuvieron pequeñas piezas (1 mm³) de la mucosa de la tráquea, bronquios primarios y del parénquima pulmonar, y se fijaron en glutaraldehído 3% (Merck) en buffer cacodilato de sodio (Sigma) 0,1 M y pH 7,2 a 4°C durante 4 horas.

Al cabo de este tiempo se lavaron en el mismo buffer y se postfijaron en tetróxido de osmio al 1% en el mismo buffer. Se lavaron nuevamente en buffer y se deshidrataron en etanol

de concentración creciente hasta etanol puro. Se transfirieron a acetona e incluyeron en araldita.

Los tacos se seccionaron en un micrótomos Sorvall-Porter Blum MT2-B y se montaron en grillas de 200 mesh. Se tiñeron con acetato de uranilo (1% en etanol 70%) y con citrato de plomo de Reynolds.

Las secciones se analizaron en un microscopio electrónico Siemens Elmiskop - 1, operando a 80 kV.

6.5.3 Análisis digital de imágenes: morfometría alveolar

Las mediciones realizadas en la región alveolar de casi todas las especies tratadas en esta Tesis (salvo *D.delphis*) se obtuvieron mediante un Analizador Digital de Imágenes (ADI) Leica Quantimet. Se llevaron al ADI preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina - eosina o tricrómico de Masson.

Se tomaron dos parámetros distintos como unidades de medición. **a)** El alvéolo. Para el alvéolo individual se evaluó el perímetro (Figura 5), el diámetro equivalente, que se obtiene a partir de considerar al alvéolo como una "esfera", y los largos máximo y mínimo; **b)** La región alveolar. Se consideró al conjunto de alvéolos comprendidos en un campo de medición de área constante. En esta zona se midió el perímetro total de intercambio gaseoso en un campo de observación, y el área alveolar total, representada por el espacio aéreo contenido en el perímetro total (Figura 5).



Figura 1: Disección de *P. blainvillei* (se destacan los pulmones). Estación hidrobiológica de Quequen, Provincia de Buenos Aires.

Figura 2: Colonia central de *O. flavescens*. Punta Norte, Chubut

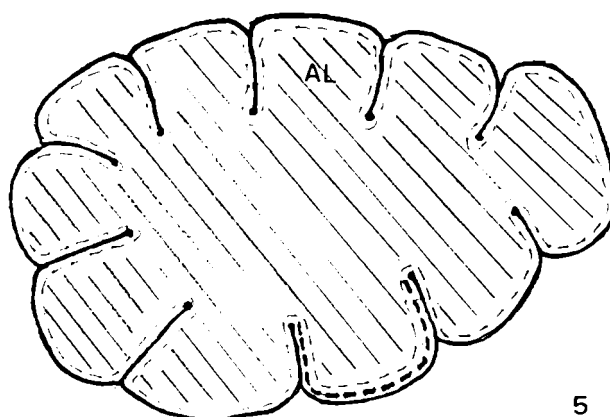
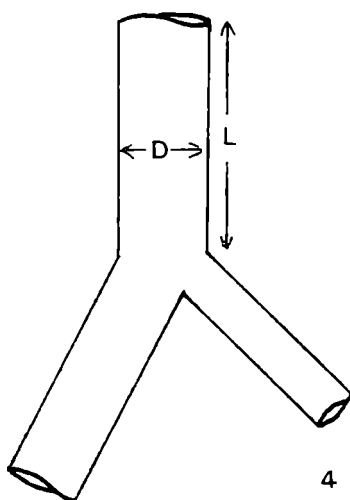


Figura 3: Procesamiento de material biológico (sistema respiratorio de cachorro)
Punta Norte, Chubut.

Figura 4: Esquema de ramificación de vías. D:diámetro, L:largo.

Figura 5: Esquema de la región alveolar. AL:alvéolo. Variables morfométricas :
Perímetro de un alvéolo, - - - Perímetro del saco alveolar, Área alveolar total \\\\\\\

RESULTADOS

PARTE 1

MACROANATOMÍA Y MICROANATOMÍA DEL ÁRBOL TRAQUEOBRONQUIAL Y DEL PARÉNQUIMA PULMONAR EN *Arctocephalus australis*, *Otaria flavescens* (Pinnipedia) Y *Pontoporia blainvillei* (Cetacea). COMPARACIONES CON OTROS MAMÍFEROS MARÍNOS

7.1 ESTUDIO COMPARADO DEL PATRÓN DE RAMIFICACIÓN DE VÍAS AÉREAS EXTRAPULMONARES

7.1.1 Introducción

El árbol bronquial consiste en una secuencia de ramificaciones, cuyo número y distribución de vías varía según la generación de la vía y el animal de que se trate (Weiss,1983). La distribución del aire ventilado depende en gran parte de la geometría del árbol bronquial (Horsfield y Cumming,1968; Schlesinger y McFadden,1981). Los mamíferos presentan variaciones en el patrón de ramificación de estas vías, de gran importancia al analizar sus implicancias funcionales.

La tráquea puede ramificarse cerca del hilio pulmonar, originando bronquios primarios de corta longitud (humano, perro, conejo), o bien puede originar ramificaciones mas tempranas presentando bronquios primarios de considerable longitud (rata, zorro) (Phalen y Oldham,1983). En algunos mamíferos (cerdo, cabra) la tráquea emite una vía colateral temprana que recibe el nombre de bronquio traqueal o bronquio extra, y que generalmente aborda la región cefálica del pulmón derecho independientemente del ingreso del bronquio primario derecho (Phalen y Oldham, 1983).

La consideración del ancho traqueal en relación a su largo es de importancia al analizar sus implicancias funcionales, ya que la capacidad del animal para intercambiar grandes volúmenes de aire por unidad de tiempo será función del valor absoluto del cociente entre el diámetro y el largo traqueal (Tarasoff y Kooyman,1973).

Los cetáceos presentan en general una tráquea corta (Slijper,1962), y los bronquios primarios varían en su longitud y patrón de ramificación. La aparición de un bronquio traqueal fué citada por otros autores en algunas especies (*Tursiops truncatus*, *Platanista gangetica*, *Inia geoffrensis*, *Stenella coeruleo-albus*), y se observa que emerge directamente de la tráquea y se introduce en el pulmón derecho (Harrison y Fanning,1974; Yamasaki y col.,1977; Drabek y Kooyman,1986; Nakakuki,1994).

En los pinnípedos la longitud de los bronquios primarios o extrapulmonares es distinta en los focidos y en los otaridos. Los primeros presentan una tráquea larga y los bronquios primarios emergen en las proximidades del hilio pulmonar, en cambio en los otaridos, la ramificación traqueal es mas temprana, originando bronquios primarios de considerable longitud (King, 1974; Tarasoff y Kooyman, 1983).

7.1.2 Resultados

7.1.2.1 Largo y diámetro traqueal

Las vías aéreas extrapulmonares representadas por la tráquea y los bronquios primarios, presentan variaciones morfométricas en las especies estudiadas.

El lobo marino peletero (*A. australis*) presentó una tráquea que se bifurca tempranamente en dos bronquios primarios (Figura 1). Así mismo, las especies pertenecientes al grupo de los delfines presentaron en común una tráquea corta (Figura 2). Se tomaron las mediciones de los largos traqueales en el lobo marino peletero (*A. australis*), el delfín franciscana (*P. blainvillei*), el delfín oscuro (*L. obscurus*) y el delfín común (*D. delphis*), y con el objeto de obtener datos comparables entre las especies analizadas, las mediciones obtenidas del largo traqueal se refieren como porcentaje del largo corporal (Tabla 1). Los tres delfines presentaron un porcentaje de largo traqueal referido al corporal muy similar: 1,9% -2,1%, mientras que el lobo marino peletero (*A. australis*) se diferencia con un porcentaje mayor (10%). Es interesante destacar que los diámetros traqueales son similares en todas las especies estudiadas y oscilan entre 1,9 y 3,1 cm.

Una diferencia notable entre los cetáceos estudiados (*P. blainvillei*, *L. obscurus* y *D. delphis*) y los pinnípedos, es que solamente los delfines presentan un bronquio traqueal que desemboca en el pulmón derecho (Figura 2).

7.1.2.2 Tráquea y bronquios primarios: relaciones morfométricas

Al analizar las relaciones existentes entre los diámetros de las vías parentales (tráquea) y las emergentes de ellas (bronquios primarios), aunque el escaso número de ejemplares no permite hacer calculos estadísticos, se observó que los valores obtenidos no son coincidentes (Tabla 2)

Sin embargo es interesante observar que la suma de los cocientes Dbd/Dtr y $Dbtr/Dtr$ en el delfín franciscana (*P.blainvillei*) y en el delfín común (*D.delphis*) prácticamente igualan el valor arrojado por la relación del diámetro del bronquio izquierdo respecto del diámetro traqueal (Dbi/Dtr). Los dos bronquios primarios en el lobo marino peletero (*A.australis*) guardan la misma relación.

Las relaciones entre el diámetro y el largo de la tráquea mostraron una gran similitud entre los delfines estudiados, pero son diferentes del lobo marino peletero (*A.australis*) que presenta un cociente muy bajo (Tabla 2).

Con el objeto de conocer la relación existente entre la tráquea y la suma de las áreas de los bronquios emergentes de esa misma vía, a partir de los diámetros medidos en cada una de estas vías, se calculó el área de sección (Tabla 3).

La relación entre el área total de las vías extrapulmonares respecto del área traqueal para los tres delfines es mayor que 1 (1.49), mientras que para el lobo marino de dos pelos es inferior a ese valor (0.82) (Figura 3).

Tabla 1: Dimensiones de las vías aéreas extrapulmonares

Especie	Ltr (cm)	Ltr (%)	Dtr (cm)	Dbd (cm)	Dbi (cm)	Dbtr (cm)
Franciscana (n: 3)	2,5	1,9 %	1,9	0,75	1,8	0,8
Delfín común (n: 1)	4	2 %	3,1	1,2	1,8	1,2
Delfín oscuro (n: 1)	4,3	2,1 %	2,9	1,8	2	1,8
Lobo marino (n: 5)	19	10 %	2,5	1,6	1,6	---

Franciscana (*P.blainvillei*)(promedio), Delfín común .(*D.delphis*), Delfín común (*L.obscuris*), y Lobo marino (*A.australis*)(promedio), Ltr:largo traqueal, Ltr(%):largo traqueal relativo al largo corporal, Dtr:diámetro traqueal, Dbd:diámetro bronquio 1º derecho, Dbi:diámetro bronquio 1ºizquierdo, y Dbtr:diámetro bronquio traqueal.

Tabla 2: Relaciones de largos y diámetros en las vías extrapulmonares

Especie	Dtr / Ltr	Dbd / Dtr	Dbi / Dtr	Dbtr / Dtr	Dbd / Dbi
Franciscana	0,76	0,39	0,94	0,42	0,41
Delfín común	0,77	0,38	0,58	0,38	0,66
Delfín oscuro	0,67	0,62	0,68	0,62	0,9
Lobo marino	0,13	0,64	0,64	---	1

Franciscana (*P.blainvillei*), Delfín común .(*D.delphis*), Delfín común (*L.obscuris*), y Lobo marino (*A.australis*). Dtr:diámetro traqueal, Ltr:largo traqueal, Dbd:diámetro bronquio primario derecho, Dbi:diámetro bronquio primario izquierdo, Dbtr:diámetro bronquio traqueal.

Tabla 3: Areas de las secciones transversales de la tráquea, bronquios primarios y bronquio traqueal

Especie	Traquea (area-cm ²)	Br.1° der (area-cm ²)	Br.1° izq (area-cm ²)	Br.traq. (area-cm ²)
Franciscana	2,83	0,44	2,54	1,25
Delfín común	7,54	2,54	5,72	1,13
Delfín oscuro	6,6	2,54	3,14	2,54
Lobo marino	4,9	2,01	2,01	-----

Br.1° der.: bronquio primario derecho, Br.1° izq: bronquio primario izquierdo, Br.traq.: bronquio traqueal. Franciscana (*P.blainvillei*)(promedio), Delfín común (*D.delphis*), Delfín común (*L.obscurus*), y Lobo marino (*A.australis*)

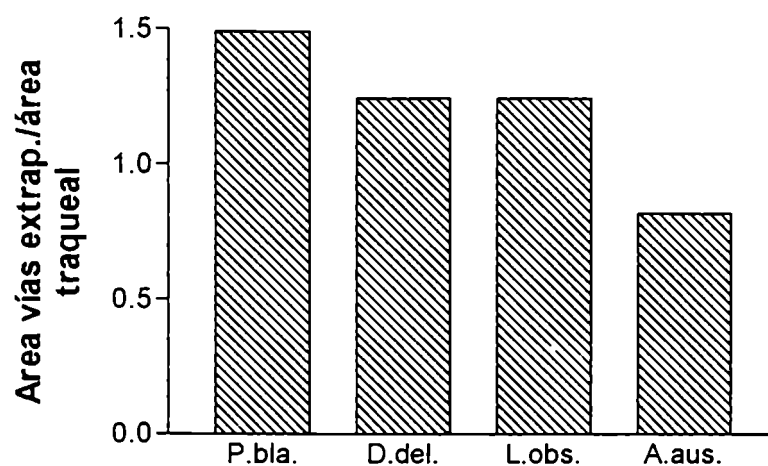


Figura 3: Relación entre el área total de las vías aéreas extrapulmonares y el área de la tráquea.

P.bla.: *P.blainvillei*, D.del.: *D.delphis*, L.obs.: *L.obscurus*, A.aus.: *A.australis*.

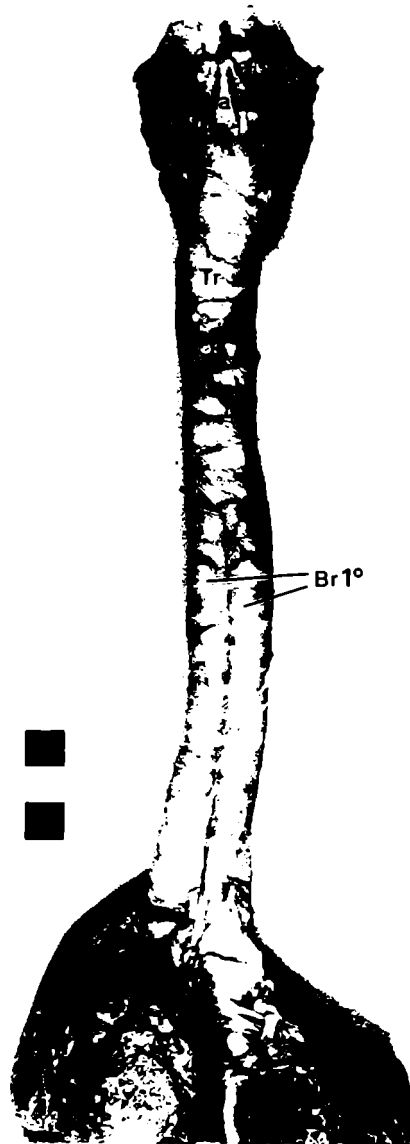


Figura 1: Vías extrapulmonares del lobo marino peleterero (*A. australis*) .Br.1°: bronquio primario o extrapulmonar, La: laringe, ➡ : punto de bifurcación traqueal (Cada cuadrado de la regla: 1 cm)



Figura 2: Vías extrapulmonares del delfín franciscana (*P.blainvillei*). **Br.1°**: bronquio primario o extrapulmonar, **Br.tr.:** bronquio traqueal, **La**: laringe, **Tr**: tráquea (Cada cuadrado de la regla: 1 cm)

7.1.3 Discusión

La presencia de un bronquio traqueal derecho aparece como una característica común para los delfines estudiados. Esta vía también fue descrita para otras especies de cetáceos como: *Tursiops truncatus*, *Peponocephala electra*, *Stenella sp.* y *Delphinus sp* (Harrison y Fanning, 1974; Fanning, 1977; Drabek y Kooyman, 1986). Entre los pinnípedos, el lobo marino peletero (*A.australis*) al igual que en las observaciones al respecto realizadas a campo en este trabajo en el león marino (*O.flavescens*), no registró la presencia de un bronquio traqueal al igual que en otros pinnípedos (*Pagophilus groenlandicus*, *Leptonychotes weddelli*, *Phoca vitulina*, *Zalophus californianus*) (Tarasoff y Kooyman, 1973; Boyd, 1975; Nakakuki, 1993), lo que lleva a suponer que **la presencia de un bronquio traqueal es una característica privativa de los cetáceos.**

Dentro de los cetáceos, el delfín oscuro y el delfín común presentaron un largo traqueal similar, pero si se tiene en cuenta el largo de esta vía en relación al largo corporal (Ltr%), los tres delfines (franciscana, delfín oscuro y delfín común) presentaron valores muy similares. Sin embargo, el lobo marino peletero (*A.australis*) se diferenció del resto por presentar una larga tráquea, sobre todo si se tiene en cuenta que su longitud corresponde al 10 % del largo corporal (mientras que en los delfines es del 2 %).

En todos los delfines estudiados se presentaron valores elevados del cociente entre el diámetro traqueal y el largo traqueal (0,67-0,76), mientras que el lobo marino peletero presentó un valor inferior para este cociente (0,10). Algunos focidos (*Pagophilus groenlandicus*, *Leptonychotes weddelli*) también presentan un valor bajo para el cociente entre el diámetro traqueal y el largo traqueal (0,10 - 0,09) (Tarasoff y Kooyman, 1973; Boshier y Hill, 1974), similar al encontrado para el lobo marino peletero.

Slijper (1962), plantea que una tráquea corta (característica exclusiva de los cetáceos) estaría involucrada en un intercambio de aire que oscilaría entre un 80 -90 % del volumen pulmonar, en comparación con la mayoría de los mamíferos terrestres que presentan un intercambio que comprende un 10 - 15 % del volumen pulmonar.

Más aún, **una tráquea corta y ancha, como presentan los delfines estudiados en la presente Tesis, favorecería flujos de aire a altas velocidades.** Esto marca una gran diferencia morfométrica a nivel de la tráquea entre los delfines y los pinnípedos.

Las relaciones entre los diámetros de las vías extrapulmonares fué un aspecto descuidado en la bibliografía existente, y una pregunta emerge al respecto: ¿como influye en el área transversal total de los bronquios primarios la aparición de un bronquio traqueal?

Si se analiza por separado los diámetros de cada bronquio primario en relación al diámetro traqueal, o bien la relación de los bronquios primarios entre si, se observa que no existe uniformidad en los cocientes obtenidos (Tabla 2).

Pero considerando que en los mamíferos terrestres el diámetro de los bronquios primarios derecho e izquierdo es coincidente, la adquisición de un bronquio traqueal en los cetáceos, que como en el caso del delfín franciscana (*P.blainvillei*) y el delfín común (*D.delphis*) equipara junto con el bronquio primario derecho el diámetro del bronquio primario izquierdo, hace pensar que **este bronquio traqueal aumentará la eficiencia en la ventilación del pulmón derecho.** En el delfín oscuro (*L.obscurus*), el protagonismo del bronquio traqueal sería mayor aún. **Esto probablemente esté asociado a la necesidad de mantener una eficiente ventilación en el corto intervalo de tiempo que el animal pasa en la interfase aire-agua, sumado a la gran actividad, que desarrolla esta especie en la superficie acuática.**

Los pinnípedos no desarrollaron el bronquio traqueal, lo que puede explicarse por el hecho de compartir un vida acuática con **permanencias prolongadas en la interfase aire-agua** (quizás en este contexto puedan considerarse como animales "buceadores" - ver 3.4), y también por **sus prolongadas estancias en tierra.** Estos hábitos, probablemente **no les demandan la necesidad de ventilaciones tan rápidas** con grandes volúmenes de aire involucrados, como ocurre en los cetáceos.

Esto se corrobora al analizar el cociente obtenido entre la sumatoria de las áreas de los bronquios primarios y el área traqueal para cada especie (Tabla 3); en todos los

delfines estudiados el área transversal total a nivel de los bronquios primarios se incrementa, mientras que el lobo marino presenta un área transversal total de los bronquios primarios semejante al área traqueal.

En relación a la morfometría de las vías aéreas extrapulmonares de las especies estudiadas se puede concluir fundamentalmente que **los delfines presentan una tráquea corta, un diámetro traqueal considerablemente elevado en relación al largo traqueal y un incremento del área transversal total a nivel de los bronquios primarios.**

¿Que consecuencias funcionales pueden plantear estas diferencias morfométricas entre los delfines y el lobo marino de dos pelos?

Se interpreta que **una tráquea de diámetro considerable, sumado al 32% promedio de incremento del área transversal en el pasaje de la tráquea a los bronquios primarios registrado en los delfines, pueden facilitar las altas velocidades a las cuales movilizan el aire durante las rápidas ventilaciones en la superficie acuática en corto tiempo, condiciones no necesarias en los pinnípedos.**

7.2 MORFOLOGIA DE LOS PULMONES Y DEL ARBOL BRONQUIAL

MAYOR EN: *Arctocephalus australis* y *Pontoporia blainvillei*

7.2.1 Introducción

La lobulación pulmonar presenta un alto grado de variabilidad entre las distintas especies de mamíferos. En la mayoría de las especies terrestres, la división generalizada del pulmón derecho en tres lóbulos, y del izquierdo en dos, representa una morfología frecuente aunque no universal (Testut y Latarjet, 1979).

Como ejemplos de dicha variabilidad se pueden mencionar los pulmones de los equinos que presentan solo lóbulos craneales y caudales, registrándose en el pulmón derecho un lóbulo accesorio. El pulmón izquierdo de varios mamíferos pequeños de laboratorio (rata, hamster) no está dividido, pero otras especies de mayor talla (conejo, cobayo) presentan división (Tyler, 1983).

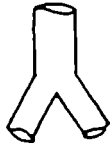

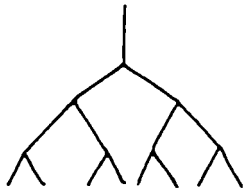
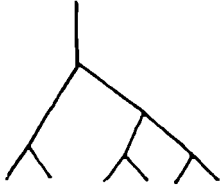
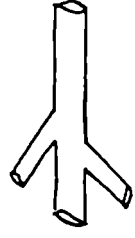
Hare (1955), define "lóbulo" como un área de tejido pulmonar ventilada por un gran bronquio, proveniente de bronquios mayores o desde la tráquea. A su vez, cada lóbulo se encuentra separado de los lóbulos vecinos por un revestimiento pleural y alimentado por un bronquio que emerge directamente del bronquio troncal de ese pulmón (Robinson, 1982).

Los diferentes patrones de lobulación pulmonar reflejan variaciones en la geometría del árbol bronquial, no obstante, los mamíferos presentan en general una ramificación dicotómica. La ramificación dicotómica puede ser clasificada en regular o irregular.

En la dicotomía regular, las ramas hijas tienen igual largo y diámetro, y el ángulo de emergencia de cada rama hija respecto de la rama parental es el mismo. La ramificación dicotómica regular puede presentar un patrón de ramificación general que puede ser simétrico o asimétrico. El patrón de ramificación simétrico se caracteriza por poseer igual número de generaciones en todas las rutas de vías aéreas, en cambio el patrón asimétrico se caracteriza por presentar variaciones en el número de generaciones de vías aéreas desde la tráquea hasta el último bronquiolo terminal (Tabla 1).

En la dicotomía irregular las ramas hijas se diferencian en largo y diámetro, y poseen ángulos de emergencia distintos (Tabla 1). En algunos casos, la rama hija mayor puede no diferenciarse de la parental en diámetro, y no poseer ángulo de emergencia, este tipo de ramificación se denomina monopodial extremo (Tabla 1).

Tabla 1: Tipos de ramificaciones dicotómicas

RAMIFICACION DICOTOMICA		
<p>Regular</p> <p>- Las ramas hijas poseen igual diámetro, largo y ángulo de emergencia.</p> 		<p>Irregular</p> <p>- Las ramas hijas poseen distinto diámetro, largo y ángulo de emergencia.</p> 
<p>Simétrico</p> <p>- El número de divisiones hasta la vía terminal es igual para todas las rutas.</p> 	<p>Asimétrico</p> <p>- El número de divisiones hasta la vía terminal <u>no</u> es igual para todas las rutas.</p> 	<p>Monopodial extremo</p> <p>- La rama hija mayor no se diferencia de la parental en diámetro, y no posee ángulo de emergencia.</p> 

Los pulmones de diversos mamíferos acuáticos presentan variaciones en la morfología pulmonar y en la geometría del árbol bronquial, y esto parece estar relacionado con la natación y los patrones de buceo (Tarasoff y Kooyman, 1973; Drabek y Kooyman, 1983).

Se efectuaron las mediciones externas de los pulmones como así también el estudio de la geometría del árbol bronquial mayor en el delfín franciscana (*P. blainvillei*) y en el lobo marino peletero (*A. australis*) debido a que solo para estas especies se obtuvieron sistemas respiratorios completos. No obstante, este estudio comparado permite confrontar dos especies que difieren en su morfología pulmonar externa.

7.2.2 Resultados

7.2.2.1 Lobulación pulmonar

A partir de la observación macroscópica de los pulmones del delfín franciscana (*P. blainvillei*) no se determinó la existencia de lobulación externa. Ambos pulmones de forma oval carecían de fisuras externas (Figura 1).

Las medidas externas de los ejemplares estudiados se presentan en la Tabla 1.

Tanto el pulmón derecho como el izquierdo, presentaron una superficie lisa, y en la región dorsal se observó una forma cónvexa.

En el lobo marino peletero (*A. australis*), los pulmones presentaron un patrón de lobulación definido (Figura 2). El pulmón derecho presentó tres lobulos bien desarrollados: cefálico, medio y caudal, y se observó al igual que en otros mamíferos un cuarto lóbulo mediastínico o infracardíaco. El lóbulo cefálico derecho de forma triangular mostró escasas subdivisiones externas. El lóbulo medio derecho se presentó alargado y de forma prismática. El lóbulo caudal derecho es expandido a modo de abanico.

El pulmón izquierdo mostró dos lóbulos: cefálico y caudal. El lóbulo cefálico izquierdo presentó una superficie irregular en su lateral externo. El lóbulo caudal izquierdo se caracterizó por presentar escasas subdivisiones y su aspecto fué semejante a su par derecho. Las medidas correspondientes a los lóbulos de ambos pulmones se presentan en la Tabla 2.

7.2.2.2 Patrón de ramificación bronquial

Según lo revelado en las placas radiográficas del delfín franciscana (*P. blainvillei*), en ambos pulmones se destacó un bronquio troncal principal (Figura 3). En el pulmón derecho se observó también la entrada del bronquio traqueal, que se ramifica en la región cefálica, independientemente del resto del árbol bronquial. En ambos pulmones, el bronquio troncal correspondiente presentó ramificaciones que originaron una serie de bronquios secundarios que se proyectaron lateralmente, generando la aparición de vías terminales "tempranas" (en pocas generaciones).

En el corte longitudinal del pulmón derecho (Figura 5), se observó que el árbol bronquial presentó una vía troncal que varió muy poco en su diámetro, mientras que las ramas colaterales presentaron vías con un diámetro inferior.

A pesar de la ausencia de lobulación pulmonar, en ambos pulmones se observó una distribución regional de los bronquios lobulares ramificados localmente en las zonas que corresponderían a los lóbulos cefálico, medio y caudal.

En el lobo marino peletero (*A. australis*), las placas radiográficas revelaron que los bronquios extrapulmonares o primarios originan los bronquios tronco principales derecho e izquierdo (Figura 4). Los bronquios troncales principales emiten ramas colaterales primarias, que se ramifican para originar árboles bronquiales independientes hacia cada lobulo pulmonar. El bronquio troncal principal derecho, emitió inicialmente una rama correspondiente al bronquio lobular cefálico. Las siguientes ramas colaterales correspondieron a los bronquios lobulares inferiores; el primero originó el bronquio lobular medio, que se ramificó en el lóbulo medio, el segundo originó el bronquio lobular infracardíaco o mediastínico que desembocó y se ramificó en el lóbulo del mismo nombre, y finalmente el bronquio lobular caudal que desembocó y se ramificó en el lóbulo caudal derecho. En el pulmón izquierdo el patrón de ramificación se mantuvo por el bronquio troncal principal izquierdo, el cual a diferencia del derecho solo emitió colaterales lobulares que desembocan y se ramifican en el lóbulo cefálico y en el lóbulo caudal. El corte longitudinal del lóbulo medio derecho reveló la existencia de una rama troncal principal de la que emergieron ramas colaterales (Figura 6). Los diámetros de las vías hijas variaron un poco entre si, y ambas vías se diferenciaron en diámetro respecto de la rama parental.

7.2.2.3 Morfometría de las vías aéreas mayores

El factor de relación de los diámetros de las vías aéreas lobulares parentales, respecto de la sumatoria de los diámetros de las vías hijas⁽¹⁾ mostró a lo largo las de cinco primeras generaciones de vías intrapulmonares, desde la entrada al pulmón izquierdo para el delfín franciscana (*P.blainvillei*), y desde la entrada al lóbulo medio derecho para el lobo marino peletero (*A.australis*), un decrecimiento de distinta magnitud en ambas especies.

El lobo marino peletero (*A.australis*) presentó valores muy similares para este factor en las cinco generaciones analizadas, mientras que el delfín Franciscana (*P.blainvillei*) presentó valores mas heterogéneos a lo largo de las sucesivas generaciones, y en algunos casos con valores inferiores a los obtenidos para el lobo marino peletero (Tabla 3).

El cociente entre los diámetros de las dos vías hijas (de cada generación) a través de las cinco generaciones estudiadas, también presentó diferencias entre el lobo marino peletero (*A.australis*) y el delfín franciscana (*P.blainvillei*) (Figura 7). En el lobo marino peletero el cociente presentó valores similares, con un valor que osciló entre 1.2 - 1.7, mientras que en el delfín franciscana se presentó mayor variación para este cociente, presentando valores como 3 y 2.5 para la 3ª y 4ª generación de vías.

(1) Factor de relación de los diámetros = $D1 / (D2 + D3)$, donde D1 es el diámetro de la vía parental, y D2+D3 es la suma de los diámetros de las vías hijas.

Tabla 1: Medidas externas de ambos pulmones en el delfín franciscana adultos (*P.blainvillei*).

LARGO (cm)			ANCHO (cm)	
Sexo	P.d.	P.i.	P.d.	P.i.
Macho	20,7	20,0	8,5	8,3
Hembra	23,0	21,2	9,4	9,1
Macho	20,7	20,5	8,5	8,5

El largo de los pulmones derecho (Pd) e izquierdo (Pi) se determinó midiendo desde el apice hasta la región caudal media. El ancho de los pulmones corresponde al valor máximo coincidente con la parte media.

Tabla 2: Medidas externas de los lóbulos de ambos pulmones en el lobo marino peletero (*A.australis*).

LARGO LOBULAR (cm)						ANCHO LOBULAR (cm)				
P. derecho			P. izquierdo			P. derecho		P. izquierdo		
Lob.	Cef.	Med.	Cau.	Cef.	Cau.	Cef.	Med.	Cau.	Cef.	Cau.
Macho (1)	8,0	11,5	9,0	10,0	10,5	7,0	4,5	9,0	7,0	9,5
Macho (2)	13,5	14,5	15,0	17,0	18,5	10,0	5,5	14,0	12,5	12,0

El largo lobular se tomo en la región media de cada lóbulo y paralelo al tronco traqueal, el ancho lobular se tomo en la región media de cada lóbulo y perpendicular al tronco traqueal. El ejemplar 1 corresponde a un subadulto, y el ejemplar 2 a un adulto. (P.derecho: pulmón derecho, P.izquierdo: pulmón izquierdo, Lob.cef.: lóbulo cefálico, Lob.med.: lóbulo medio, Lob.cau: lóbulo caudal, ma: macho).

Tabla 3: Factor de relación de los diámetros de las vías aéreas parentales vs. la sumatoria de los diámetros de las vías hijas.

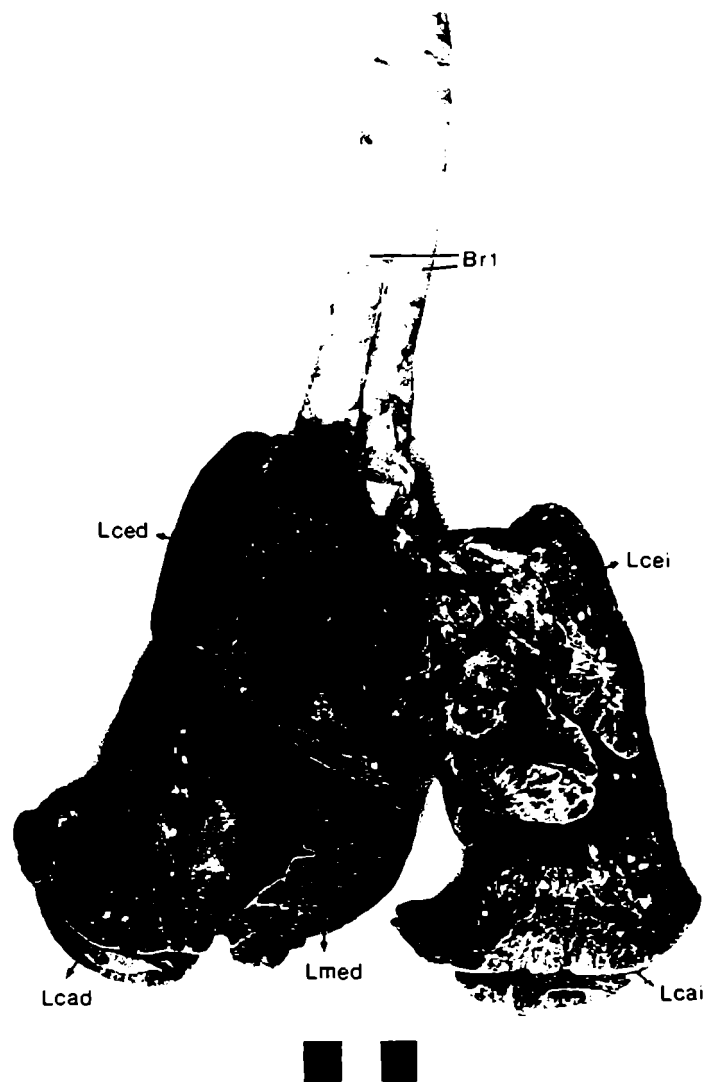
Generación	1°	2°	3°	4°	5°
<i>P.blainvillei</i>	1.0	0.58	0.87	0.80	0.58
<i>A.australis</i>	0.70	0.77	0.78	0.69	0.68

Factor de relación: diámetro de vía parental / suma de los diámetros de las vías hijas: (D1 / D2+D3) en el transcurso de 5 generaciones (1°,2°,3°,4°,5°), desde la entrada del bronquio 1° izquierdo al pulmón izquierdo en *P.blainvillei*, y desde la entrada del bronquio lobular medio derecho al lóbulo medio derecho de *A.australis*.



1

Figura 1: Pulmones de del delfín franciscana (*P. blainvillei*). Vista dorsal externa. **Ce:** cefálico, **Ca:** caudal, **Der:** derecho, **Izq:** izquierdo (cada cuadrado de la regla: 1 cm).



2

Figura 2: Pulmones del lobo marino peletero (*A.australis*). Vista dorsal externa. **Br.1°:** bronquios primarios, **L.ce.d.:** lóbulo cefálico derecho, **L.me.d.:** lóbulo medio derecho, **L.ca.d.:** lóbulo caudal derecho, **L.ce.i.:** lóbulo cefálico izquierdo, **L.ca.i.:** lóbulo caudal izquierdo (cada cuadrado de la regla: 1cm)

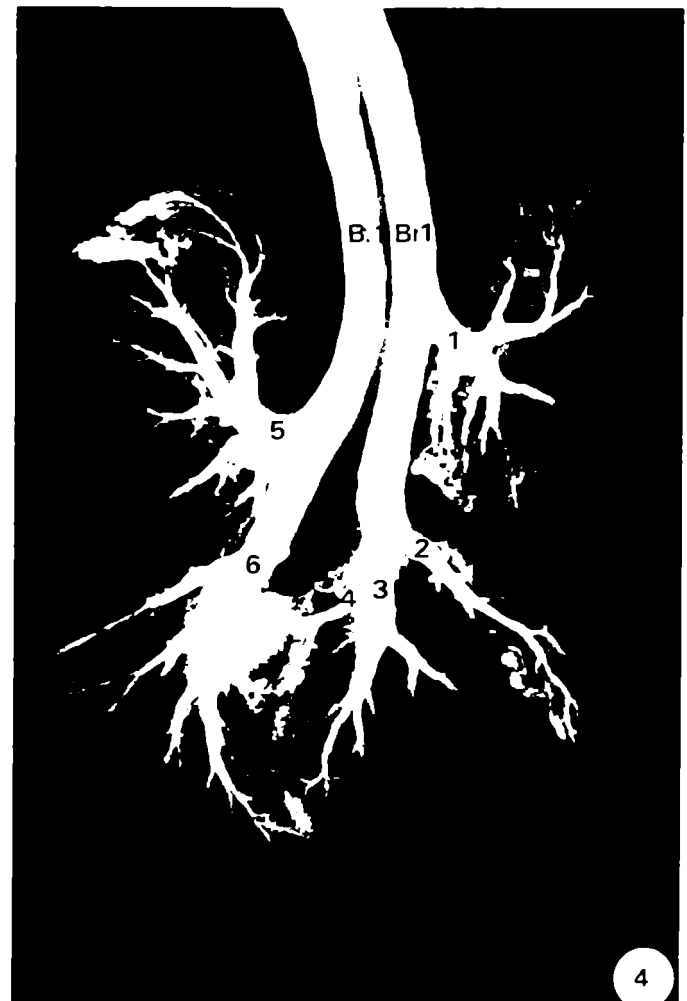


Figura 3: Radiografía del pulmón izquierdo del delfín franciscana (*P.blainvillei*). **Hi:** hilio, **Br.tr.:** bronquio troncal

Figura 4: Radiografía de los pulmones del lobo marino peleterero (*A. australis*). **Br.1º:** bronquio primario, **1:** bronquio lobular cefálico derecho, **2:** bronquio lobular medio derecho, **3:** bronquio lobular caudal derecho, **4:** bronquio lobular infracardiaco derecho, **5:** bronquio lobular cefálico izquierdo, **6:** bronquio lobular caudal izquierdo.



5

Figura 5: Corte longitudinal del pulmón derecho completo del delfín franciscana (*P. blainvillei*). **Hi:** hilio, **Br.tr.:** bronquio troncal (cada cuadrado de la regla: 1 cm)



6

Figura 6: Corte longitudinal del lóbulo medio del pulmón derecho del lobo marino peletero (*A.australis*).

Hi: hilio, **Br.L.:** bronquio lobular, **Br.S.:** bronquio segmentario (cada cuadrado de la regla: 1 cm)

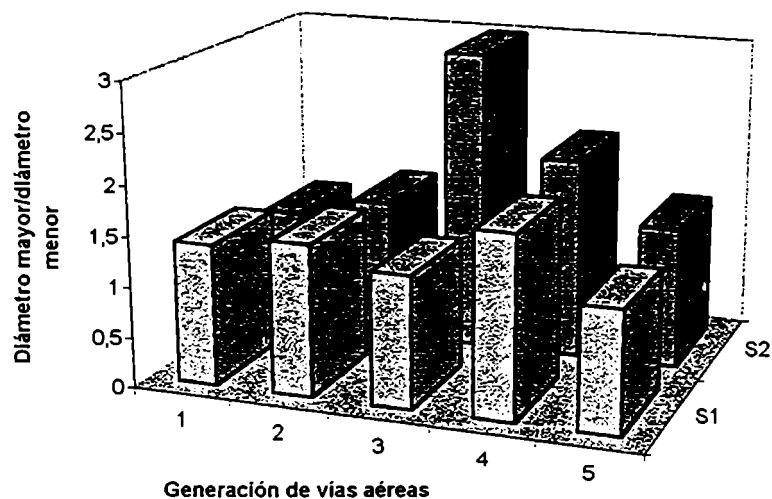


Figura 7: Relación de los diámetros de las vías hijas en las cinco primeras generaciones de vías aéreas (pulmón derecho en el delfín franciscana, *P. blainvillei* (S2), y lóbulo medio derecho en el lobo marino peletero, *A. australis* (S1)).

7.2.3 Discusión

En general, los pulmones de cada especie tienen características topográficas que se corresponden con la forma de la caja torácica.

Se destaca la presencia de un patrón de lobulación en el lobo marino peletero (*A. australis*) similar a la mayoría de los mamíferos terrestres, y la ausencia de lobulación pulmonar en el delfín franciscana (*P. blainvillei*)

Las razones posibles para poder explicar una reducción o ausencia total de lobulación son desconocidas (Tarasoff y Kooyman, 1973). Slijper (1962) relacionó la ausencia de lobulación, y la geometría de vías extrapulmonares (ver cap. 7.1) con la capacidad de movilizar importantes volúmenes de aire a altas velocidades y en corto tiempo.

Otra posible interpretación de las diferencias en la morfología pulmonar externa entre otáridos y cetáceos radicaría en que los primeros presentan períodos de actividad terrestres, en los que ocurren saltos y corridas durante el desplazamiento. Un pulmón lobulado al presentar una mayor superficie y una distribución del peso mas homogénea, podría absorber mejor los impactos internos durante la locomoción terrestre (Tarasoff y Kooyman, 1973).

Según lo observado en las distintas especies de mamíferos acuáticos, y por lo registrado en el lobo marino peletero (*A. australis*) y en el delfín franciscana (*P. blainvillei*), se concluye que **existe una tendencia a la reducción de la lobulación pulmonar externa en los mamíferos que permanecen mas tiempo en el medio acuático.**

Es importante destacar que las variaciones morfológicas externas se acompañan también por variaciones en la geometría bronquial. El **delfín franciscana (*P. blainvillei*), presentó un árbol bronquial asimétrico, con ramificaciones dicotómicas irregulares, que permiten clasificarlo como monopodial extremo.** Los valores obtenidos en el cociente entre los diámetros de las vías hermanas comprendidas en un rango de 1.16 - 3 (Figura 7), reflejan el alto grado de irregularidad en las dicotomías bronquiales, destacando el grado de diferencia entre el diámetro de los bronquios hermanos.

Los cetáceos en general presentan un patrón de ramificación irregular (asimétrico), y este tipo de ramificación genera la aparición de bronquiolos terminales en generaciones tempranas de las vías aéreas (Tarasoff y Kooyman, 1973).

¿Qué implicancia funcional tiene este patrón de ramificación en los cetáceos?. Las placas radiográficas obtenidas **en el delfín franciscana (*P. blainvillei*)** (Figura 3) mostraron **vías aéreas terminales muy próximas a la vía troncal principal de cada pulmón**. Esto permite interpretar que **la distancia que media entre el saco alveolar y la vía troncal es corta, facilitando una rápida y total renovación del aire durante la ventilación en superficie**.

El **lobo marino peletero (*A. australis*)**, presentó un árbol con ramificaciones **dicotómicas irregulares, pero sin llegar a ser de tipo monopodial extremo**, dado los valores homogéneos que se registraron en el cociente entre los diámetros de las vías hermanas luego de una dicotomía (1.20 - 1.75) (Figura 7), a lo largo de las primeras cinco generaciones. Este tipo de ramificación irregular, permite suponer que **la ventilación por unidad de tiempo, comparada con la de los cetáceos, sería “menos eficiente”, dado la mayor distancia que media entre los sacos alveolares y la vía troncal principal**.

¿Qué influencia tienen en el flujo del aire, las diferentes relaciones de los diámetros de las vías aéreas en las sucesivas generaciones en el árbol bronquial?

Horsfield y Cumming (1967) plantearon que gran parte de la resistencia al flujo del aire en las vías respiratorias se asocia con las relaciones morfométricas entre vías afines (bronquios hermanos con su vía parental). Estos autores demostraron en un estudio llevado a cabo en el sistema respiratorio humano que el grado de decrecimiento del diámetro de una vía aérea con respecto al diámetro de su vía parental debería ser de 0.79 ⁽¹⁾, para generar una resistencia mínima al flujo aéreo.

Si se toma en cuenta una dicotomía regular, los diámetros de las vías hijas son iguales ($D_2=D_3$), y por lo planteado en el párrafo anterior será:

$$D_2 = D_3 = 0.79 \cdot D_1 \text{ (a)}$$

para así alcanzar una mínima resistencia la flujo aéreo.

(1) D_2 (diámetro de la vía hija) = 0.79 · D_1 (diámetro de la vía parental)

Finalmente se puede plantear la relación existente entre la vía parental y las vías hijas como:

$$D_1 / D_2 + D_3 \text{ (b)}$$

Si se asocian las ecuaciones (a) y (b) se llega a: $D_1 / D_1 \cdot 0.79 + D_1 \cdot 0.79$; y si se plantea que $D_1 = 1$, el valor obtenido para este cociente que implica una mínima resistencia al flujo aéreo es 0.63 (Boshier y Hill, 1974).

Cabe entonces preguntarse: ¿qué valores presentan los mamíferos marinos estudiados para la relación $D_1 / D_2 + D_3$?

Las mediciones realizadas en el lobo marino peletero (*A.australis*), plantean que el grado de decrecimiento durante las cinco primeras generaciones en el lóbulo medio derecho, osciló entre 0.68 y 0.77. En cambio la franciscana (*P.blainvillei*) presentó un grado de decrecimiento mas variable (1.0 - 0.58) en las cinco primeras generaciones de vías las aéreas en el pulmón izquierdo, y en algunos puntos fue menor a lo medido en *A.australis* (0.58 en 2º y 5º generación).

A partir de estos resultados, es difícil determinar cual árbol bronquial en las primeras cinco generaciones de vías aéreas intrapulmonares ofrece menor resistencia al flujo del aire. Si bien el delfín franciscana (*P.blainvillei*) presentó los valores mas bajos para este cociente, solo lo hizo en dos generaciones de vías. Por otro lado, el lobo marino peletero (*A.australis*) presento valores más homogéneos, y no muy lejanos al valor óptimo de 0.63.

¿Qué valores presentan para este cociente otros mamíferos marinos?

La foca de Weddell (*L.weddelli*) solo se aproxima a 0.63 en las vías de cuarta y sexta generación (Boshier y Hill, 1974). En cambio, en los árboles bronquiales de dos cetáceos, la tonina (*T. truncatus*) y la marsopa (*Phocoenoides sp.*), el valor promedio en las siete primeras generaciones fué de 0.68 y 0.70 respectivamente (Drabek y Kooyman, 1986).

Si se analizan conjuntamente todos estos datos no parece emerger un conclusión precisa. El lobo marino peletero (*A.australis*) presenta un rango de valores para el cociente estudiado similar al obtenido por otros autores en dos especies de delfines.

El delfín franciscana (*P.blainvillei*) no presenta similitud alguna con las otras especies, y la foca de Weddell (*L.weddelli*) aparece como la especie que presenta la menor resistencia al flujo aéreo en las primeras generaciones de vías aéreas intrapulmonares. Sin embargo, **si el análisis comparado se plantea dejando de lado las barreras taxónomicas y teniendo en cuenta los patrones de buceo de cada especie puede emerger una conclusión interesante.**

Los patrones de buceo del delfín franciscana (*P.blainvillei*) son diferentes a los presentados por el lobo marino peletero (*A.australis*) (ver 2.3 y 2.6). El patrón de buceo de la tonina (*T.truncatus*) es similar al descrito para el lobo marino peletero (Gaskin,1982), mientras que la foca de Weddell (*L.weddelli*) se destaca por presentar buceos muy profundos y duraderos (Kooyman, 1989).

Es importante considerar que los datos obtenidos para cada especie no son del todo comparables, a pesar de la similitud de diámetros presente entre algunas especies, debido a que: a) las rutas aéreas pueden corresponder a distintas regiones del pulmón, y b) los árboles bronquiales presentan un patrón de ramificación basicamente diferente.

Pero, mas allá de estas consideraciones es claro que **el árbol bronquial presenta una morfología y morfometría diferente entre las especies estudiadas en esta Tesis y algunas de las especies estudiadas por otros autores.**

Este último razonamiento nos lleva a plantear que **si dos mamíferos acuáticos (cetáceo o pinnípedo) presentan un patrón de ventilación similar, probablemente presenten características similares en su arquitectura bronquial, lo que pone de manifiesto (al igual que en cap. 7.1) la importancia de una eficiente y rápida ventilación en la superficie como presiones evolutivas en el diseño del sistema respiratorio en estas especies.**

7.3 ESTUDIO COMPARADO DE LA HISTOLOGÍA DEL ÁRBOL TRAQUEO-BRONQUIAL Y DEL PARÉNQUIMA PULMONAR

7.3.1 Introducción

La anatomía general de todas las especies de mamíferos marinos se ajusta a las presiones ambientales que impone la actividad subacuática. Esta variabilidad estructural se manifiesta en el sistema respiratorio desde el patrón de ramificación de las vías extrapulmonares, hasta el patrón de lobulación y la microarquitectura pulmonar. Pero, ¿qué variaciones presenta la histología del árbol traqueobronquial y del parénquima pulmonar en estas especies?.

Como fue mencionado en la Introducción (4.1), la microanatomía del sistema respiratorio de las escasas especies estudiadas varía también con respecto a la de los mamíferos terrestres, y probablemente esas variaciones reflejen ajustes claves para la actividad subacuática.

Hasta el presente, han sido descriptos los sistemas respiratorios de no mas de 10 especies (Belanger,1940; Wislocki y Belanger,1940; Boshier y Hill,1974; Harrison y Fanning,1974; Boyd, 1975; De Carlo y col.,1976; Henk y Haldiman,1930), y entre ellas, las descripciones más completas se realizaron en un fócido: la foca de Weddell (*Leptonychotes weddelli*), y en un cetáceo: la tonina (*Tursiops truncatus*). En estos trabajos se desarrolló un estudio de la microanatomía de las vías aéreas, descuidando la interpretación de la microanatomía pulmonar, lo que lleva a una falta de acuerdo en la nomenclatura que se asigna a las vías aéreas intrapulmonares.

Estas investigaciones destacan diferencias en las especies estudiadas en relación a la distribución de la musculatura lisa y del cartílago en las vías aéreas terminales, y a la interpretación anatómica e histológica de las glándulas asociadas a las paredes de las vías aéreas mayores (Boyd,1975; De Carlo,1976).

Debido a las pocas especies estudiadas, cabe preguntarse: ¿las diferencias observadas responden a variantes excepcionales?, o ¿existe un patrón microanatómico que se repite en determinados mamíferos marinos y no en otros?.

Frente a estas preguntas nos planteamos como objetivo ampliar el estudio morfológico a especies no descritas que desarrollan distintos comportamientos.

7.3.2 Resultados

El estudio microanatómico de las vías aéreas de todas las especies muestreadas (6.2) permitió encontrar rasgos morfológicos comunes. Sin embargo, algunas características histológicas comprendidas en el grupo de los pinnípedos difieren de las que comparten las especies del grupo de los cetáceos. Los resultados que se presentan a continuación, son comunes a ambos grupos; se señalará cuando corresponda, las diferencias encontradas.

A los efectos descriptivos, se tomará al león marino sudamericano (*O. flavescens*) como ejemplar tipo dentro de los pinnípedos, y al delfín franciscana (*P. blainvillei*) como modelo dentro de los cetáceos.

7.3.2.1 Vías aéreas extrapulmonares

La mucosa de la **tráquea** y de los **bronquios primarios** (extrapulmonares) está compuesta por un epitelio de tipo pseudoestratificado cilíndrico ciliado, en el que se reconocen tres tipos celulares: **células cilíndricas ciliadas**, **células caliciformes** y **células basales piramidales**. (Figura 1).

Estas últimas, son células bajas, cuyo ápice no alcanza la luz traqueal. Presentan un núcleo con nucleolo evidente y se consideran células de reposición. Las células cilíndricas ciliadas poseen también un núcleo ovoide con cromatina laxa y nucleolo desarrollado, el núcleo se ubica en la zona basal, media o apical, tal como ocurre en los epitelios pseudoestratificados. En el dominio apical se observan las cilias y los corpúsculos basales.

La fina granulación presente en el citoplasma apical de estas células (Figura 2) corresponde a glicoconjugados sulfatados, dado que se evidenciaron vesículas azul alcíán pH 0,5 positivas, lo que permite suponer que se trata de un epitelio secretor. El tercer tipo celular, corresponde a las células caliciformes que presentan la morfología característica con núcleo basal y la secreción acumulada en la zona supranuclear.

La investigación histoquímica de los glicanos por ellas sintetizados, mostró los siguientes resultados: los gránulos de secreción son fuertemente PAS positivos y se ubican desde la zona supranuclear hasta la membrana apical (Figura 3). Al investigar la presencia de glicanos sulfatados y/o carboxilados con el azul alcíán pH 2,5; se observó una tinción altamente positiva en posición ligeramente distal en el citoplasma, aunque el porcentaje de células fue menor que las PAS positivo. La coloración con azul alcíán pH 0,5 fue apical y de menor intensidad.

Teniendo en cuenta estos resultados, se observa que el tipo de glicoconjugados elaborados por las células caliciformes es de azúcares neutros y carboxilados y en menor proporción, sulfatados.

Finalmente, con la secuencia HOK-PA*S (Volz, 1987) se observó la presencia de glicanos sialatados en la zona apical de las células caliciformes de la tráquea solamente, no observándose en el resto de las vías aéreas. La posición preferencialmente distal de los glicoconjugados sulfatados y sialatados en el citoplasma celular, permite suponer que la sialatación y sulfatación estos procesos ocurren tardíamente durante la síntesis. Las células caliciformes descritas, se distribuyen aleatoriamente en el epitelio de revestimiento pero aumentan en número a nivel de la desembocadura de las glándulas de la mucosa (Figura 4).

En el león marino sudamericano (*O. flavescens*), el epitelio descansa sobre una **lámina subepitelial** muy gruesa, de alrededor de 15 μm de espesor promedio en la tráquea, el que decrece en los bronquios, alcanzando un espesor de 10 μm en los bronquios intrapulmonares mayores, y menor aún con la ramificación de las vías aéreas hasta llegar al espesor típico de los otros tejidos.

Esta lámina está formada por: 1) la membrana basal, en contacto con el dominio basal de las células epiteliales (Figura 30); como es característico de las membranas basales es PAS positiva y da también positivo cuando se emplea una técnica inmunocitoquímica para la investigación de colágeno IV (Figura 5) y la técnica para fibras reticulares permite demostrar la presencia de colágeno III. 2) La lámina subepitelial, se ubica adyacente a la membrana basal y al microscopio óptico se observa una matriz aparentemente homogénea con las técnicas de rutina. Toma el azul de anilina, y esta coloración permite observar una estructura fibrilar. Una observación semejante se obtuvo del estudio de cortes de 1 μm de piezas incluidas en resina y coloreadas con azul de toluidina. El espesor es de 15 μm . Es azul alcian pH 2,5 y PAS débilmente positivas (Figura 6). Es frecuente la observación de linfocitos emigrantes atravesando la lámina subepitelial. La microscopía electrónica revela que las fibrillas irregularmente dispuestas corresponden a colágeno I (Figura 30 y 31).

En el delfín franciscana (*P. blainvilei*), la lámina subepitelial es de no más de 7 μm de espesor y presenta características histológicas coincidentes con las del león marino sudamericano (*O. flavescens*) (Figura 7).

Por debajo de la lámina subepitelial, se encuentra el **corion**, que se divide en **dos estratos** (Figura 8).

El **corion superficial** constituido por una red de finas fibras colágenas, visualizadas con el azul de anilina de la técnica de Masson, y delgadas fibras elásticas, observadas con la técnica de orceína nítrica. Quedan allí comprendidos distintos elementos celulares del tejido conectivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos de distinto calibre y nervios.

El segundo estrato o **corion elástico**, está representado por una capa de gruesas fibras elásticas (Figura 9), de disposición longitudinal y que dan positivo frente a la coloración de orceína nítrica. Estas fibras se encuentran agrupadas en fascículos, presentando un diámetro entre 68 - 120 μm ., siendo el diámetro promedio de cada fibra elástica de 4,5 μm y marcan el límite con la submucosa. La submucosa aloja a las glándulas, amplios senos venosos y tejido linfático.

Las **glándulas de la submucosa** tanto en el león marino sudamericano (*O.flavescens*), como en el lobo marino peletero (*A.australis*), se conectan con la luz traqueal o con la de los bronquios extrapulmonares a través de un conducto excretor formado por la invaginación del epitelio de revestimiento de la vía aérea. En la cripta de origen del conducto, el epitelio se transforma en cilíndrico y pierde las cilias . En el citoplasma apical de estas células se observan gránulos de secreción PAS positivo y azul alcian pH 2,5 positivo. Esta secreción se observa también extracelularmente, tapizando la luz del conducto. La lámina subepitelial se adelgaza bruscamente a nivel de la cripta glandular (Figura 4). El conducto excretor presenta menor longitud con la disminución del calibre de la vía aérea. En la tráquea media y superior el conducto se profundiza en el corion y submucosa, originando en su trayecto, numerosos senos glandulares (Figura 10).

A través de cortes seriados se pudo establecer la morfología general de estas glándulas determinándose dos regiones: el **seno glandular** que en su extremo proximal se conecta con el conducto excretor, y los **adenómeros** en la región mas distal (Figura 11). En los cortes histológicos de las tráqueas y bronquios extrapulmonares se observa que la abundancia relativa de adenómeros tubulares a senos es de 3 : 1.

Los **senos glandulares** son estructuras saculiformes ramificadas, con un diámetro que oscila entre 90 μm y 450 μm . Están revestidos por un epitelio que transcurre de plano a cúbico alto. Los senos revestidos por epitelio plano no muestran actividad secretora (Figura 12). Cuando las células adquieren la morfología de un epitelio cúbico bajo, se comienzan a evidenciar cambios morfológicos celulares que denotan procesos de síntesis. El núcleo muestra cromatina laxa, nucleolo desarrollado y en las coloraciones tricrómicas se observa un fino puntillado en el citoplasma apical. Estos cambios se potencian con el aumento de la altura de las células (Figura 13). Los bordes apicales de los senos con epitelio plano, suavemente ondulados, se convierten en festoneados a medida que aumenta la altura del epitelio y en la membrana plasmática apical, se observan al microscopio óptico microvellosidades, de corta altura que constituyen una chapa estriada. Las células se vuelven piriformes emitiendo protrusiones hacia la luz (Figura 13), que quedan conectadas

con la célula glandular por un pedúnculo largo y delgado, al tiempo en que desaparecen las microvellosidades. Al llegar al máximo desarrollo se estrangulan y se liberan a la luz del seno, constituyendo una modalidad secretoria del tipo apócrino.

El análisis histoquímico mostró que estas células elaboran en su proceso secretor azúcares neutros, ya que las técnicas de OHK - PA⁺ - Bh -PAS, y PAS dieron positivo en las finas vesículas que se acumulan en el citoplasma apical subterminal de la célula (Figura 14)

Al investigar la presencia de glicanos carboxilados y sulfatados (Azul alcian pH 2,5) y sialatados (OHK - PA⁺S) se observó su presencia en la zona más apical de la célula y en las vesículas de secreción apócrina. Con el azul alcian a pH 0,5 se observó coloración en las mismas zonas aunque con menor intensidad, demostrándose la presencia de glicanos sulfatados. Estas pequeñas vesículas se ven fusionándose con la membrana plasmática lo que sugiere una modalidad secretora de tipo merócrino. Las técnicas de sulfato azul de nilo y sudan III dieron negativo, evidenciando falta de síntesis de grasas, mientras que la técnica de mercurio y azul de bromofenol coloreó vesículas del citoplasma perinuclear y la contenida en las vesículas apicales de secreción apócrina de color azul rojizo (Figura 15).

Los **adenómeros** emergen de los senos y son túbulo-alveolares ramificados. Su diámetro oscila entre 15 μ m y 60 μ m, observándose los de mayor diámetro en las proximidades de los senos. Su luz es regular.

Las células glandulares son cúbicas altas o piramidales y su morfología intracelular así como su respuesta a las técnicas histoquímicas varía a lo largo del tubo secretor.

En la zona proximal, las células tienen un citoplasma altamente vacuolado. El núcleo se ubica en el extremo basal y se observa aplanado y heterocromático o ligeramente ovoide con cromatina más laxa y nucleolo evidente.

Los cortes semifinos y coloreados con azul de toluidina permiten distinguir vesículas secretorias individuales, claras y en ocasiones débilmente metacromáticas (Figura 16). Estas células muestran una reacción PAS intensamente positiva coincidente con núcleos planos, y ligeramente más débil en correspondencia con núcleos ovoides. Son azul alcian pH 2,5 positivas y negativas a pH 0,5.

Estas técnicas revelan una síntesis y secreción de azúcares neutros y carboxilados. No se observó sialatación. La morfología coincide con la de una glándula mucosa (Figura 17).

Los adenómeros de menor diámetro y ubicados aparentemente en el extremo distal del túbulo glandular presentan células piramidales con núcleo esférico y nucleolo conspicuo. El citoplasma es finamente vacuolado y en ocasiones presenta escasas vesículas claras, rodeando un pequeño lumen central. La técnica de mercurio y azul de bromofenol, da débilmente positivo (Figura 18) y tanto el PAS como el azul alcian a distintos pH se observan negativos. Los cortes semifinos coloreados con azul de toluidina, muestran las vesículas incoloras. Esta última observación induce a pensar que si bien no se detecta la presencia de azúcares, la carencia de vesículas teñidas por el tetróxido de osmio, típico de vesículas cargadas con proteínas, hace que la glándula no pueda definirse como serosa típica.

Externamente a los senos glandulares y a los adenómeros se observan las células mioepiteliales. Se evidencian en los cortes semifinos incluidas en la lámina basal. Presentan núcleo ovoide con cromatina finamente puntillada y su eje mayor es paralelo al plano transversal de corte del adenómero (Figura 19). Se colorean intensamente con la técnica de mercurio y azul de bromofenol evidenciando el alto contenido proteico dado evidentemente por los microfilamentos de actina. En cortes tangenciales a los túbulos se pudo ver que estas células adoptan formas de bandas, dispuestas regular, circular y paralelamente en el adenómero. Sus extremos suelen mostrar una ligera ramificación terminal (Figura 20).

El desarrollo de las glándulas del corion es menor en los bronquios extrapulmonares que en la tráquea, coincidentemente con el menor grosor de la pared de estas vías.

En el delfín franciscana (*P. blainvillei*), las glándulas también son tubulares simples ramificadas, se extienden entre el segundo y tercer estrato del corion y estos adenómeros se continúan directamente con el conducto excretor, no observándose la presencia de senos glandulares. La tardía fijación del material de cetáceos, dado las condiciones de muestreo, no permitió implementar las técnicas histoquímicas para caracterizar la secreción (Figura 21).

En ambos grupos, se observa en la submucosa un gran desarrollo de senos vasculares e infiltración linfocitaria con alto porcentaje de células plasmáticas periglandulares (Figura 22)

7.3.2.2 Pulmón

a- Morfología interna: definición de la microanatomía pulmonar

El primer problema que se planteó al comenzar los estudios microanatómicos del pulmón, fue el de definir su microarquitectura, a fin de adoptar la nomenclatura mas adecuada para las vías aéreas que transcurren por el estroma pulmonar hasta alcanzar los alvéolos.

El pulmón consta de: 1) un **estroma** de sostén integrado por la pleura y el tejido conectivo que contiene a las vías aéreas intrapulmonares, vasos sanguíneos y linfáticos, y nervios, y 2) el **parénquima**.

La **pleura** visceral en las especies estudiadas está constituida por tejido conectivo rico en fibras elásticas. De él parten prolongaciones que penetran en el órgano formando tabiques conectivos elásticos, con escasas fibras musculares lisas que dividen a cada lóbulo pulmonar (en el caso de los pinnípedos) o al pulmón unilobular (en el caso de los cetáceos), en lobulillos.

En el león marino sudamericano (*O. flavescens*) la división del pulmón en lobulillos, se puso de manifiesto en las secciones histológicas al observar áreas poligonales de 1,5 mm de largo y 1 mm de ancho promedio. Los tabiques que delimitan estas áreas tienen un espesor promedio de 0,18 mm. Debe destacarse que los de mayor grosor, proceden de la zona del hilio pulmonar, y en él están contenidas las vías aéreas intrapulmonares de mayor diámetro. Las trabéculas conectivas emergentes, son lo suficientemente delgadas y de grosor semejante, como para no permitir esbozar una distinción entre lobulillos de distinto orden. Estas trabéculas conectivas se extienden formando una red entre el hilio y la pleura pulmonar visceral que se adosa a la costal y sigue las dilataciones inspiratorias del torax.

En el delfín franciscana (*P. blainvillei*), los límites de los lobulillos determinados por tabiques de conectivo fueron difíciles de observar, y por lo tanto sólo la presencia de los vasos sanguíneos y bronquiolos que se encuentran en el escaso tejido conectivo que los separa facilitó la diferenciación del límite del lobulillo.

b- Vías aéreas intrapulmonares: problemas relacionados con su denominación

Según se citó en la introducción (4.1), la descripción histológica de las vías aéreas realizada por distintos autores, es coincidente con nuestras observaciones hasta las vías intralobulares mayores.

En los **mamíferos no marinos**, las capas tisulares de las vías aéreas mayores se mantienen hasta la desembocadura de ellas en los sacos alveolares, con excepción de la capa de cartílago que desaparece en las vías de 0,5 a 1 mm de diámetro. En estas vías se manifiestan paralelamente otras modificaciones como: 1) la presencia de un epitelio cilíndrico de revestimiento y la desaparición de las células caliciformes, 2) mayor desarrollo de la capa muscular, en comparación con las vías de mayor diámetro, 3) músculo en fascículos.

En **todas las especies de mamíferos marinos estudiadas**, ya fueran de pinnípedos o cetáceos, se encontró en las vías aéreas todos los cambios citados a medida que disminuía su calibre, con excepción de la ausencia de cartílago en las vías próximas a la región alveolar. Éste se mantuvo presente hasta la desembocadura de la vía aérea en el saco alveolar.

Esta situación conjuntamente con la dificultad de definir lobulillos intrapulmonares de distintas categorías en las preparaciones histológicas, llevó a decidir nombrar a estas vías aéreas como intermedias o interlobulillares y adjudicando el nombre de vías aéreas menores o terminales a las que abordan el lobulillo alveolar.

c- Histología del árbol bronquial

Las vías aéreas intralobulares mayores (diámetro promedio: 10 mm, con un rango de 15 - 9 mm, en *O.flavescens* y 5 mm, con un rango de 9 - 4 mm, en *P.blainvillei*) tanto en pinnípedos como en cetáceos presentan las mismas características histológicas que la tráquea y los bronquios extrapulmonares, con excepción de la capa de cartílago que apareció en los cortes histológicos en forma de placas, sin constituir un anillo único. El epitelio de revestimiento es de tipo pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes. La lámina subepitelial presenta características similares a las descritas en las vías aéreas extrapulmonares, aunque de menor grosor. Se mantiene el corion superficial y elástico, aunque este último es menos conspicuo. En el león marino sudamericano (*O.flavescens*) en la submucosa se destaca la presencia de las mismas estructuras glandulares descritas en la tráquea y en los bronquios extrapulmonares, aunque la abundancia relativa de adenomeros tubulares respecto de los senos glandulares, decrece. En el delfín franciscana (*P.blainvillei*) no se encontraron glándulas en la submucosa de las vías aéreas mayores intrapulmonares.

La capa muscular, se incrementa en ambos grupos constituyendo un anillo de músculo liso que se ubica entre la submucosa y el cartílago. A medida que estas vías disminuyen su calibre en las sucesivas divisiones, las capas tisulares de la pared se adelgazan transformándose la capa muscular en la más prominente.

Las vías aéreas intermedias o interlobulillares se encuentran en los tabiques conectivos que separan a los lobulillos y presentan un diámetro promedio de 4,5 mm, con un rango de 8 - 2 mm en el león marino sudamericano (*O.flavescens*) y 2,5 mm, con un rango de 4 - 1,5 mm, en el delfín franciscana (*P.blainvillei*). El epitelio de revestimiento en las vías de mayor diámetro es de tipo pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes. Se hace más bajo, a medida que se reduce el diámetro de los bronquios, reduciéndose también el espesor de los compartimientos de tejido conectivo internos con respecto de la capa muscular.

En el león marino sudamericano (*O.flavescens*), se observa en la submucosa un menor desarrollo de las glándulas, las que están conformadas solamente por adenómeros tubulares, mientras que en el delfín franciscana (*P.blainvillei*) están completamente ausentes.

Es importante señalar el alto grado de repliegue de la mucosa, dado por la contracción de las fibras musculares lisas de disposición circular. A continuación se observaron placas irregulares de cartílago.

También debe señalarse, que mediante el estudio de cortes seriados de pulmones, se observó en los pinnípedos (*O.flavescens* y *A.australis*) la existencia de comunicaciones colaterales ("shunts") entre las vías aéreas interlobulillares, luego de la cual continúan ramificándose por 2 ó 3 generaciones hasta abordar el lobulillo. Estas comunicaciones no se observaron en las vías aéreas equivalentes de los cetáceos.

Los vías aéreas menores o terminales corresponden a las que abordan el lobulillo o saco alveolar. Su diámetro promedio es de 0,5 mm, rango de 2 - 0,2 mm. en *O.flavescens* y 0,4 mm, rango de 1,5 - 0,2 mm, en *P.blainvillei*. Están revestidos por un epitelio cilíndrico bajo o cúbico con cilias que se transforman en cúbico sin cilias en las últimas generaciones (Figura 23). Las células caliciformes son escasas. A este nivel, el corion es más delgado y sin estructuras glandulares en el león marino sudamericano (*O.flavescens*). La adventicia es escasa o inexistente. En el delfín franciscana (*P.blainvillei*) se destaca en el corion una disposición particular de la capa muscular; ésta no muestra un espesor uniforme, sino que, a partir del estudio de cortes seriados y la observación de cortes longitudinales de estas vías, se pudo observar que las fibras musculares forman paquetes definidos que se interpretan tridimensionalmente como anillos cintiformes de musculatura lisa (Figura 24); (serán tratados en detalle en Capítulo 7.5). Estos comienzan a aparecer en los bronquiolos terminales, y se observan en corte, como protusiones notorias hacia la luz de la vía.

En el león marino sudamericano (*O.flavescens*) se pudo observar la existencia de un corto bronquiolo respiratorio, cuya presencia se confirmó con la observación de saculizaciones alveolares en los moldes de resina poliéster. Este segmento terminal no se observó en el delfín franciscana (*P.blainvillei*).

7.3.2.3 Parenquima pulmonar

La vía aérea respiratoria desemboca en los sacos alveolares. En el león marino sudamericano (*O. flavescens*) están rodeados de tejido conectivo con abundantes fibras colágenas y elásticas. El largo y ancho promedio de cada acino es de 2175 μm y 1900 μm respectivamente.

Los tabiques alveolares pueden ser de lecho capilar simple o doble (Figura 25 y 26). Los tipos celulares mas frecuentes observados al microscopio electrónico de transmisión son : a) células de tipo I o escamosas (Figura 27); estas células conforman una superficie continua de espesor mínimo, los núcleos ovalados se encuentran distantes debido a las extensas prolongaciones citoplasmáticas que presentan; b) células de tipo II o alveolares (Figura 28). Se destacan los cuerpos lamelares (Figura 29), que contienen sustancias surfactantes. También se registraron macrófagos, algunos ubicados en la superficie apical de este epitelio plano alveolar; se observaron así mismo células del endotelio capilar y elementos figurados de la sangre. En los cetáceos, las observaciones son coincidentes.

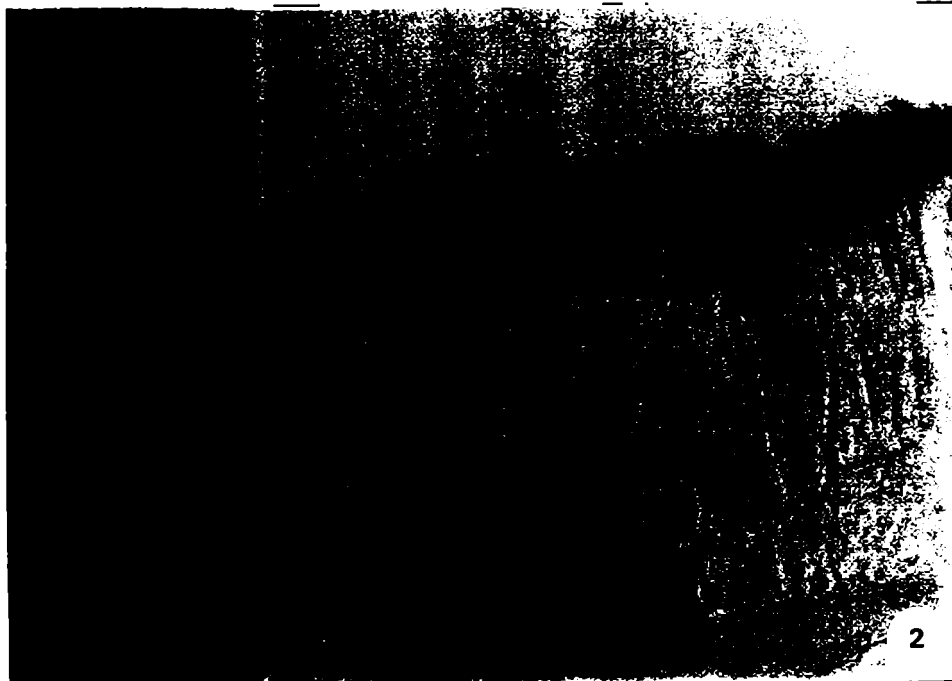
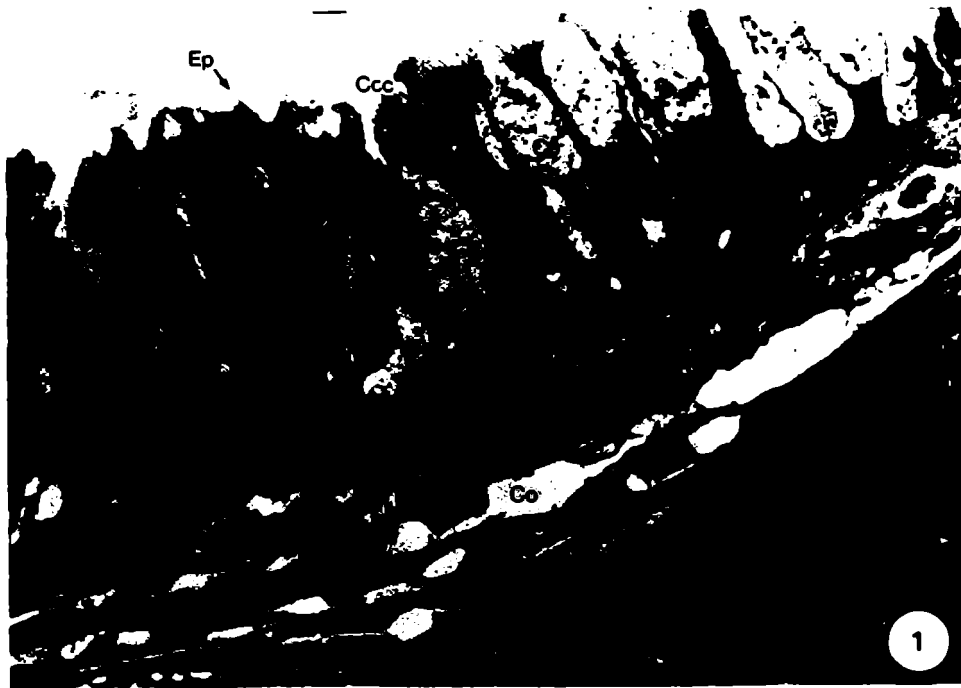


Figura 1: Sección semifina de un corte transversal de la traquea de *O. flavescens*. **Ep:** epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, **Cc:** célula caliciforme, **Ccc:** célula cilíndrica ciliada, **Cbp:** célula basal piramidal, **Co:** corion, **Ct:** cartílago, **Ls:** lámina subepitelial (Coloración: azul de toluidina) (Aumento: 1000 x).

Figura 2: Granulaciones apicales de las células cilíndricas ciliadas del epitelio pseudoestratificado de la traquea de *O. flavescens*. **Ep:** epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, **Ci:** cilias, **Gr:** granulaciones, **Ls:** lámina subepitelial (Coloración: Azul de alcian pH 0,5) (Aumento: 400 x)

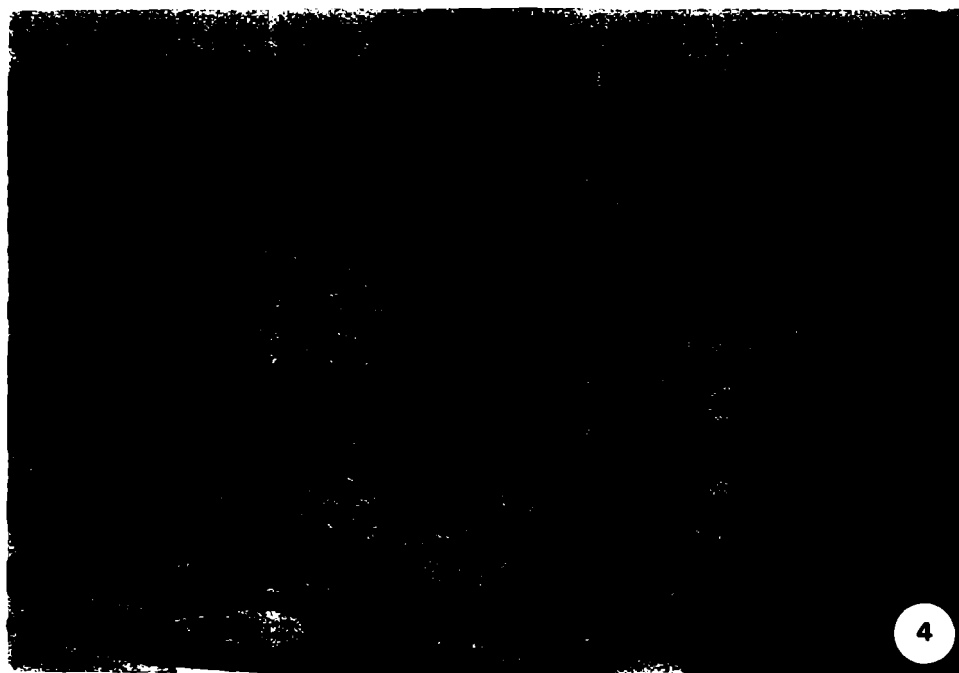


Figura 3: Secreción PAS positiva en el epitelio seudoestratificado de la tráquea de *O. flavescens*. **Ep:** epitelio seudoestratificado cilíndrico ciliado, **Gr:** gránulos, **Ls:** lámina subepitelial (Coloración PAS) (Aumento: 400x).

Figura 4: El epitelio (**E**) de revestimiento de la vía aérea se invagina originando un conducto excretor (**C**) epitelio cilíndrico sin cilias que profundiza hasta la submucosa, originando en su trayecto, numerosos senos glandulares (**SG**) que se continúan en adenómeros tubulares (**AT**) (Coloración: Azul de alcian pH: 2,5) (Aumento: 250x)

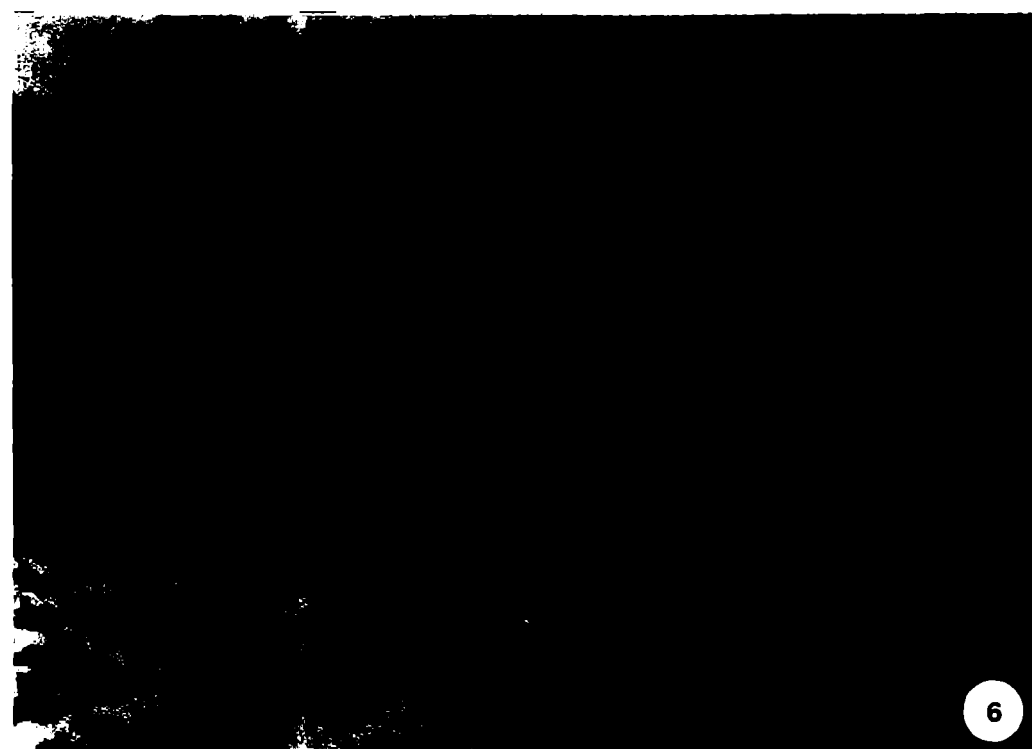
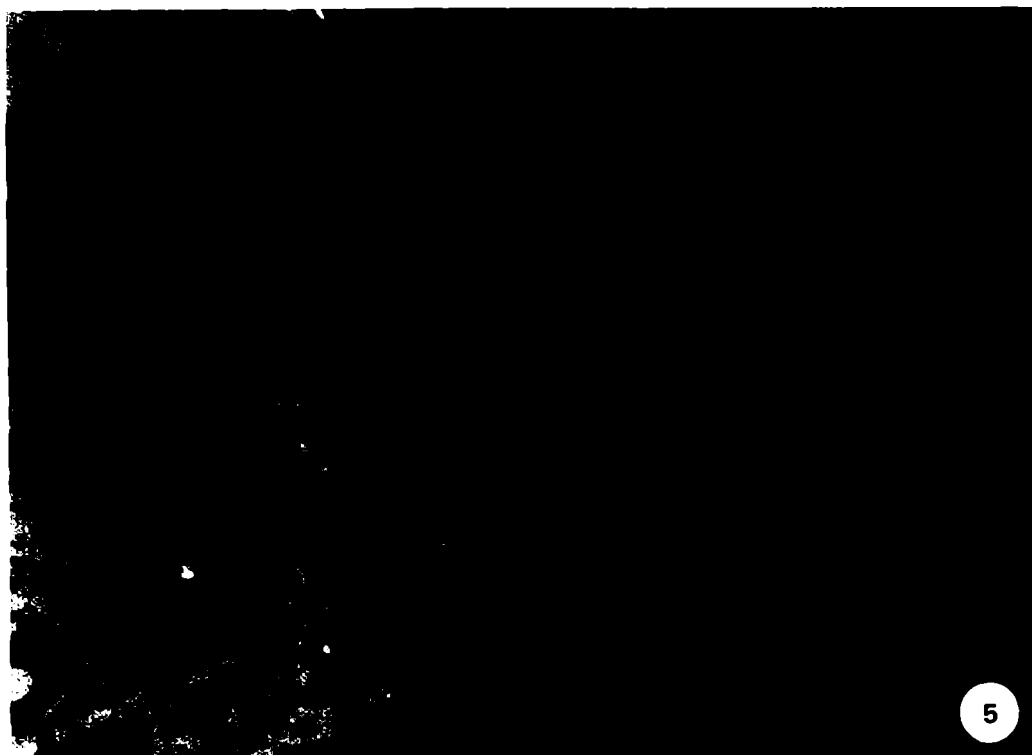


Figura 5: Detección de colágeno IV en membranas basales en mucosa traqueal de *O. flavescens*. **Co:** corion, **Ep:** epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, **Ls:** lámina subepitelial, **Vs:** vaso sanguíneo (Aumento: 400x)

Figura 6: Mucosa traqueal de *O. flavescens*. **Co:** corion, **Ep:** epitelio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado, **Ls:** lámina subepitelial (Coloración: Azul de alcian pH 2,5 y PAS)(Aumento: 400x)

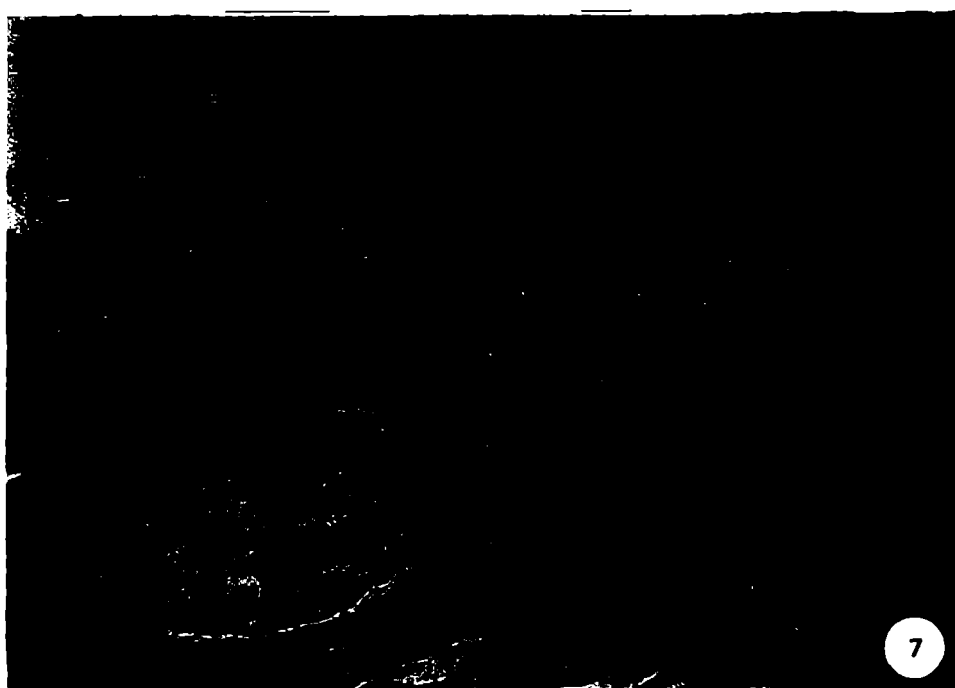


Figura 7: Corte transversal de la mucosa traqueal de *P.blainvillei*. **At:** adenómeros tubulares, **Cr:** cripta, **Ep:** epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, **Fe:** fibras elásticas (Coloración: Tricrómico de Masson) (Aumento: 400x)

Figura 8: Corte transversal de la mucosa y submucosa traqueal de *O.flavescens*, donde se observa el corion superficial y el corion elástico. **Co:** corion, **Fe:** fibras elásticas, **Sm:** submucosa (Aumento: 400x)

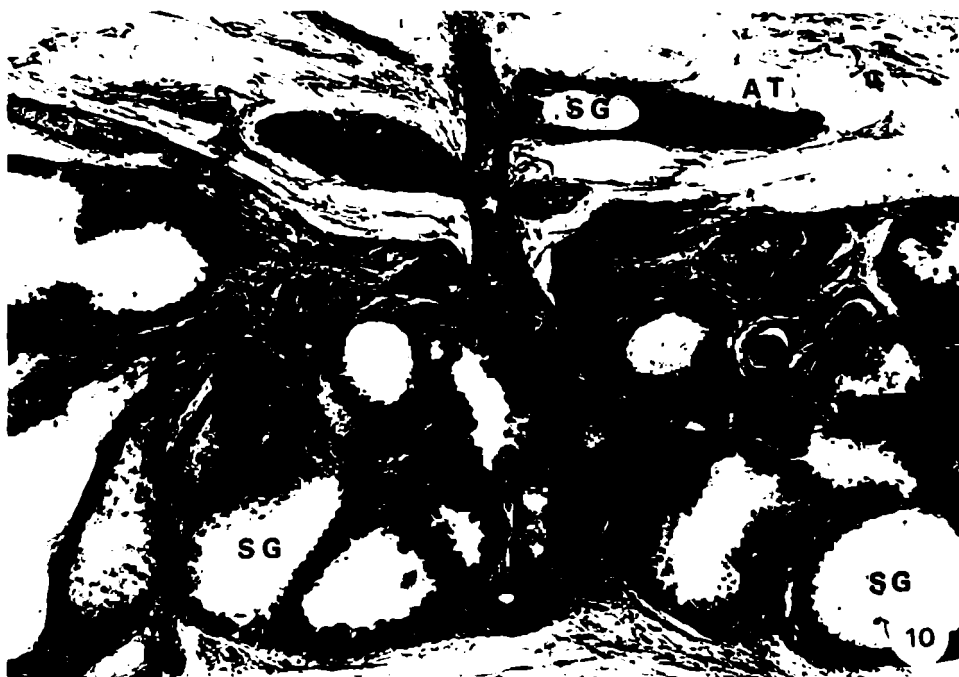
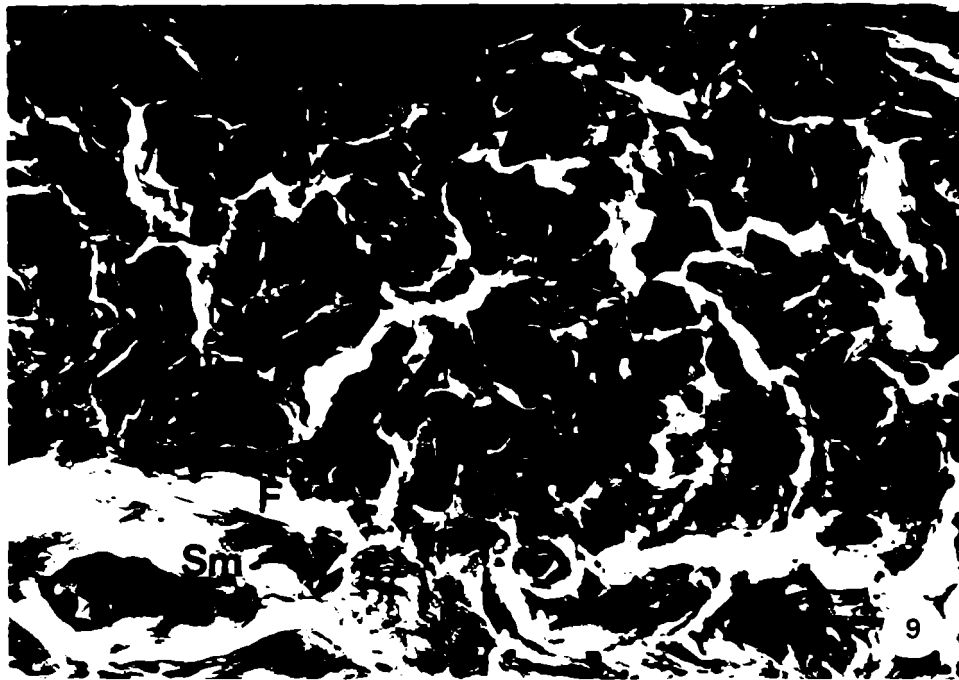
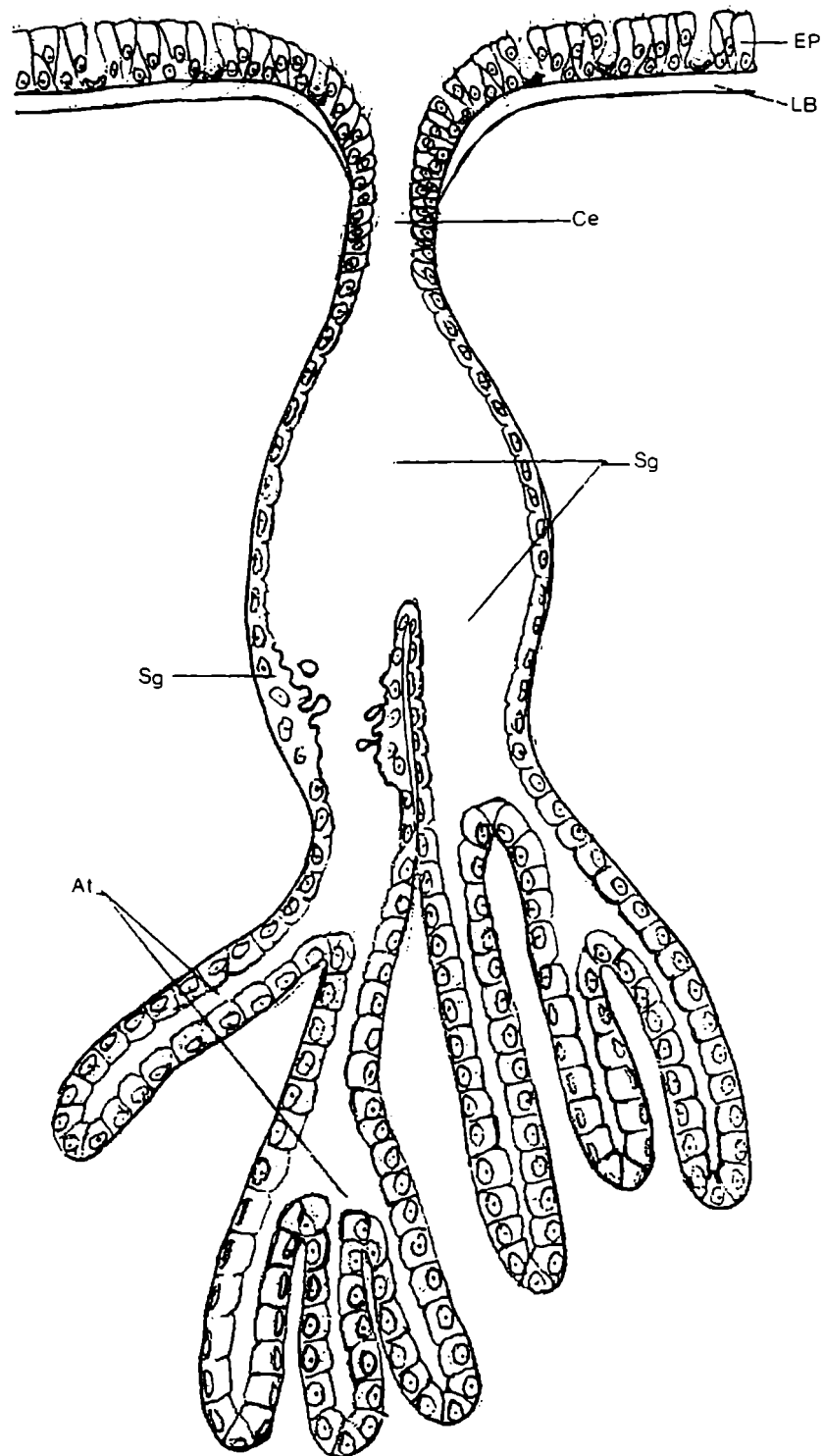


Figura 9: Corion elástico de la tráquea de *O.flavescens*. Fa: fascículo, Fe: fibra elástica, Sm: submucosa (Aumento: 1000x)

Figura 10: Se observa el conducto excretor (C), senos glandulares (SG), adenómeros tubulares (AT) (Coloración: Tricromico de Masson) (Aumento: 400x)



11

Figura 11: Morfología general de la glándulas de la submucosa traqueobronquial de *O. flavescens*. Reconstrucción llevada a cabo mediante cortes seriados. **Ce:** conducto excretor, **Sg:** seno glandular, **At:** adenómeros tubulares.

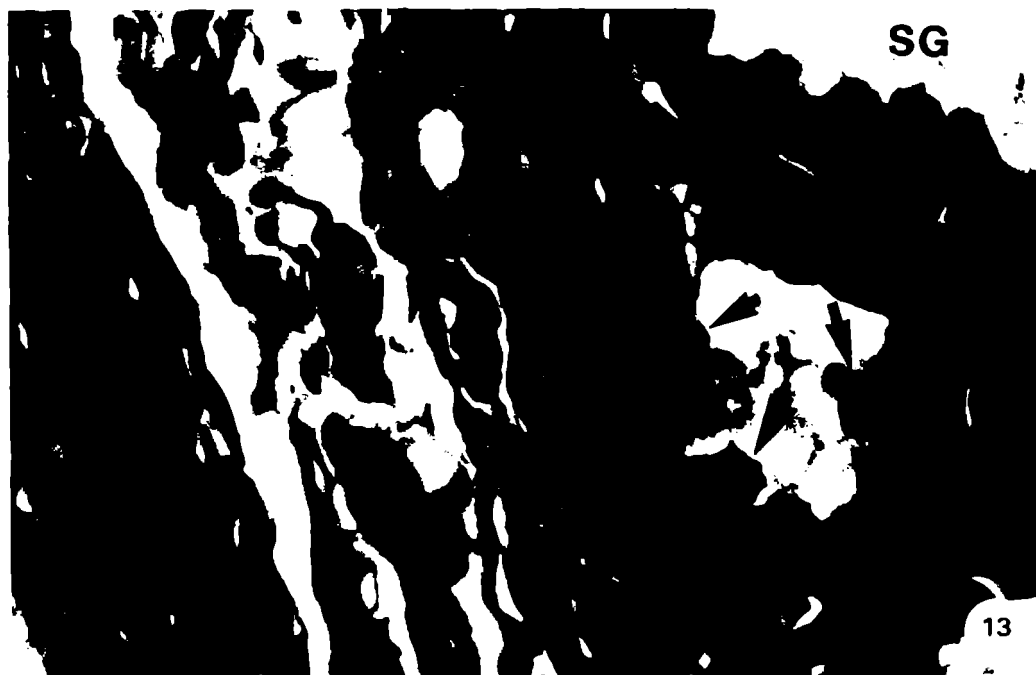
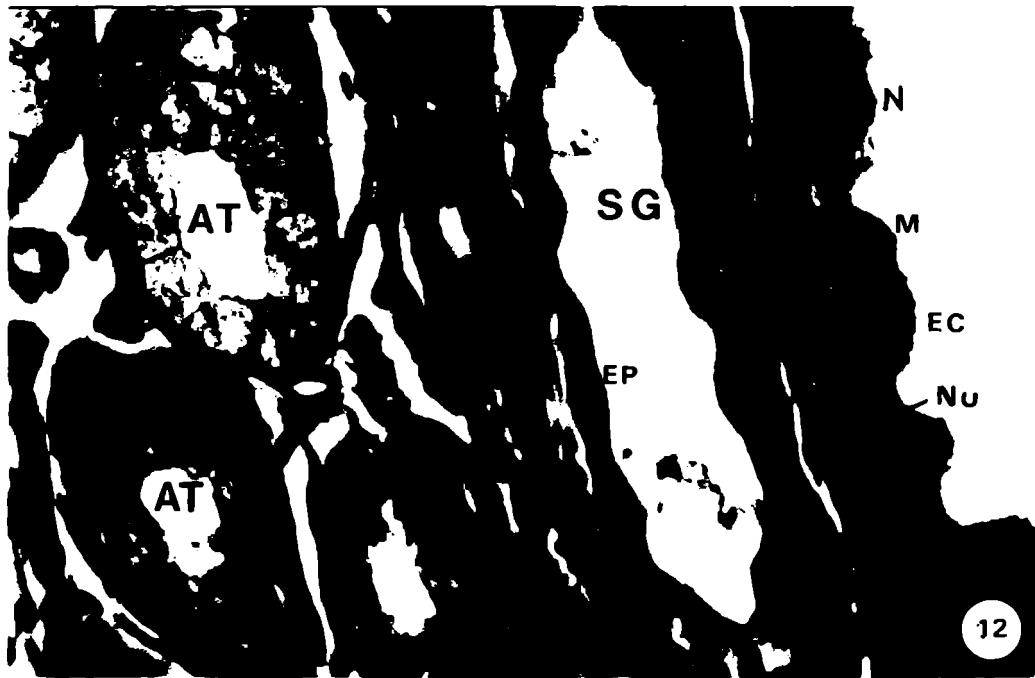


Figura 12: Los senos glandulares, revestidos por epitelio plano (EP) no muestran actividad secretora, mientras que en aquellos revestidos por epitelio cúbico (EC) se comienzan a evidenciar cambios morfológicos celulares que denotan procesos de síntesis. Núcleo (N) con cromatina laxa y nucleolo (Nu) conspicuo. Microvellosidades (M) apicales, senos glandulares (SG), adenómeros tubulares (AT) (Coloración: Tricrómico de Masson)(Aumento: 400x).

Figura 13: Finalmente las células glandulares se vuelven piriformes emitiendo protrusiones hacia la luz (punta de flecha), al tiempo que pierden las microvellosidades . SG: seno glandular (Coloración: Tricrómico de Masson)(Aumento: 400x).

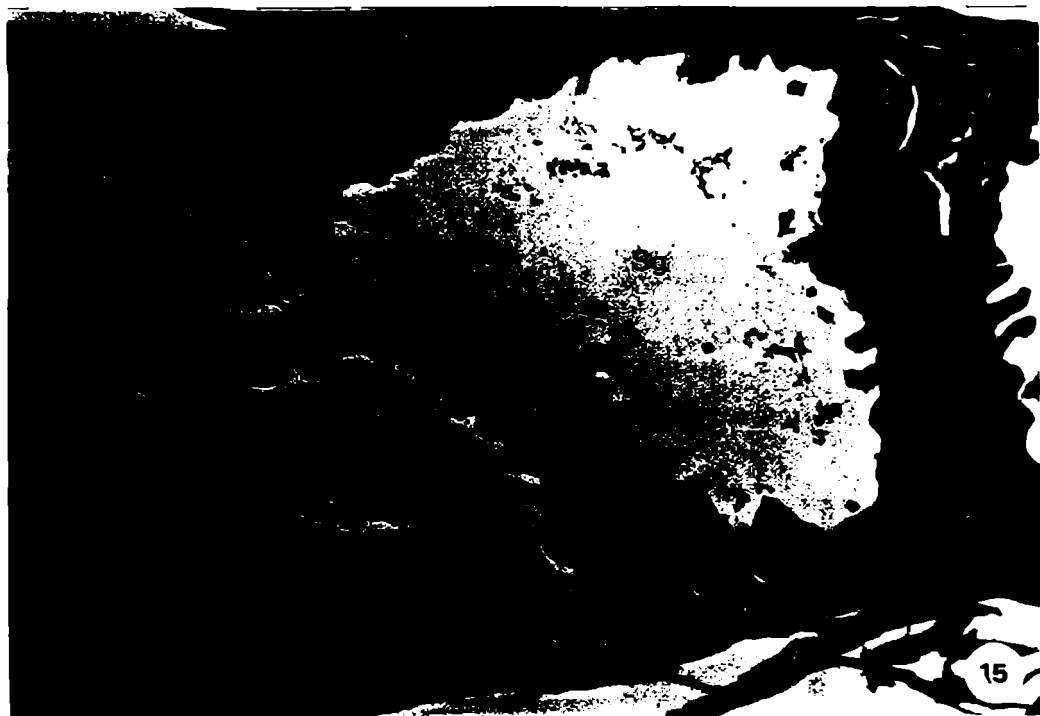


Figura 14: Detalle de la pared del seno glandular (Sg). Se observan distintos estadios de secreción apócrina y la presencia de gránulos PAS + en la región apical de las células glandulares, con modalidad secretora de tipo merócrino (Coloración: PAS) (Aumento:400x).

Figura 15: Mediante una técnica específica para la demostración de proteínas se observa que las protrusiones apócrinas de las células de revestimiento de los senos glandulares (Sg)(*) reaccionan intensamente y son liberadas al lumen , manteniendo su forma, lo que induce a suponer que el contenido es de alta viscosidad (Coloración: Mercurio y azul de bromofenol) (Aumento: 250x)

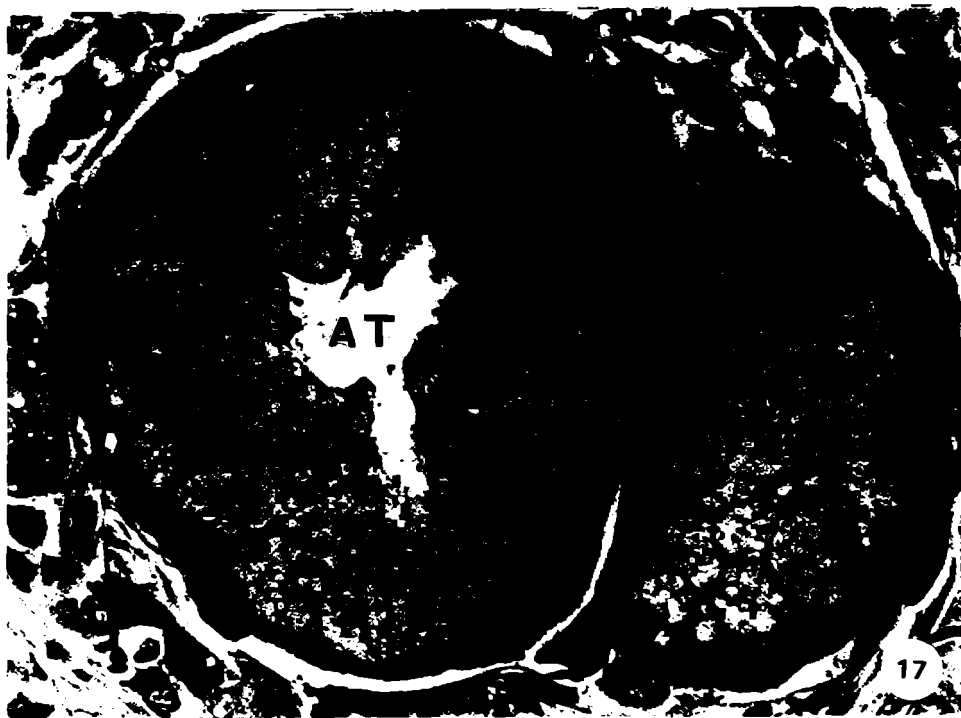


Figura 16: Vista panorámica de la mucosa y submucosa traqueal. Se distinguen glicoconjugados carboxilados y sulfatados en la región apical de las células de los senos glandulares (SG) y en la mayoría de las glandulares de los adenómeros tubulares (AT) (Coloración: Azul de alcian, pH:2,5). La coloración de Azul de alcian a pH:1.0 y de HOK - PA*S dan debilmente +, indicando escasa presencia de glicoconjugados sulfatados y sialatados.

Figura 17: Sección semifina transversal de dos adenómeros tubulares (AT) tapizados con típicas células mucosas. (Coloración: Azul de toluidina) (Aumento:400x).

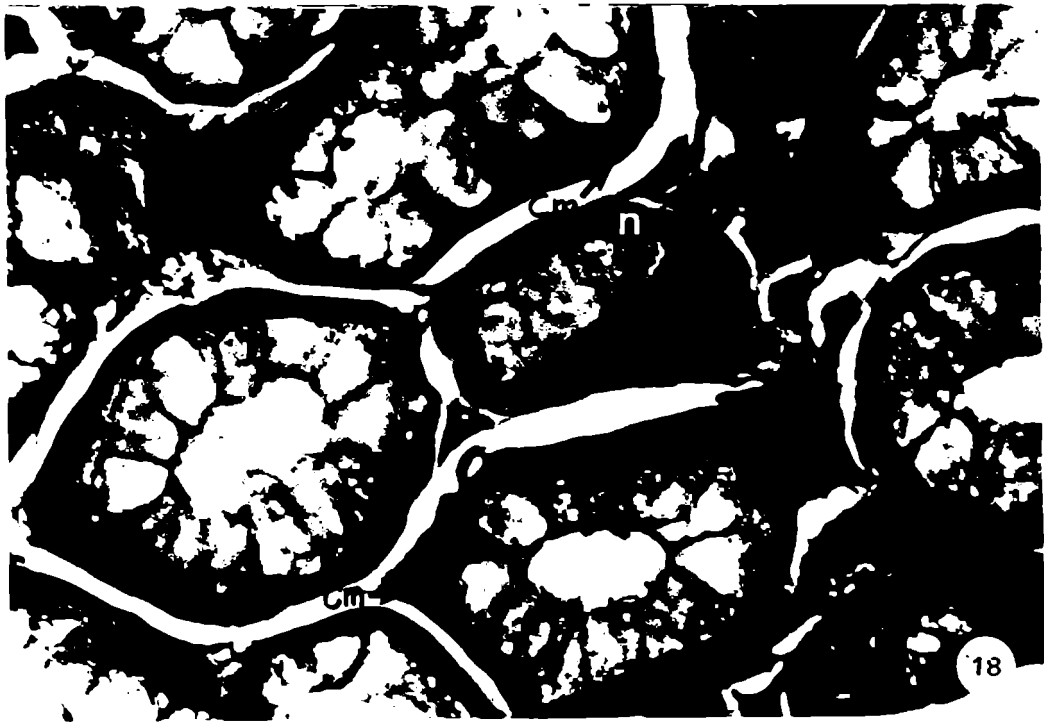


Figura 18: Células aparentemente serosas de las porciones terminales de los adenómeros tubulares. Se caracterizan por presentar núcleo (n) esférico, gránulos supranucleares ricos en proteínas, y por limitar un lumen estrecho (punta de flecha). Cm: célula mioepitelial (Coloración: Mercurio y azul de bromofenol) (Aumento:400x).

Figura 19: Corte tangencial de un adenómero tubular. Se observan las células mioepiteliales (Cm) con disposición regular, orientación circular y forma en banda. N: núcleo, Nu: nucleolo. (Coloración: Mercurio y azul de bromofenol) (Aumento:1000x).



Figura 20: La técnica de Numarsky de contraste interferencial, permite observar ramificaciones protoplasmáticas (*) de las células mioepiteliales. N: núcleo, Nu: nucleolo (Coloración: PAS) (Aumento: 1000X)

Figura 21: Submucosa traqueal de *P.blainvillei*. Se pueden observar adenómeros tubulares (At) que no presentan un buen estado de conservación. Fe: fibras elásticas, Ct: cartílago (Aumento: 250x)

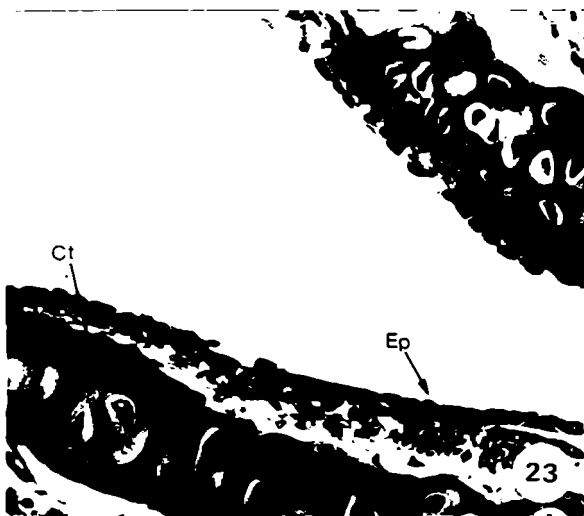
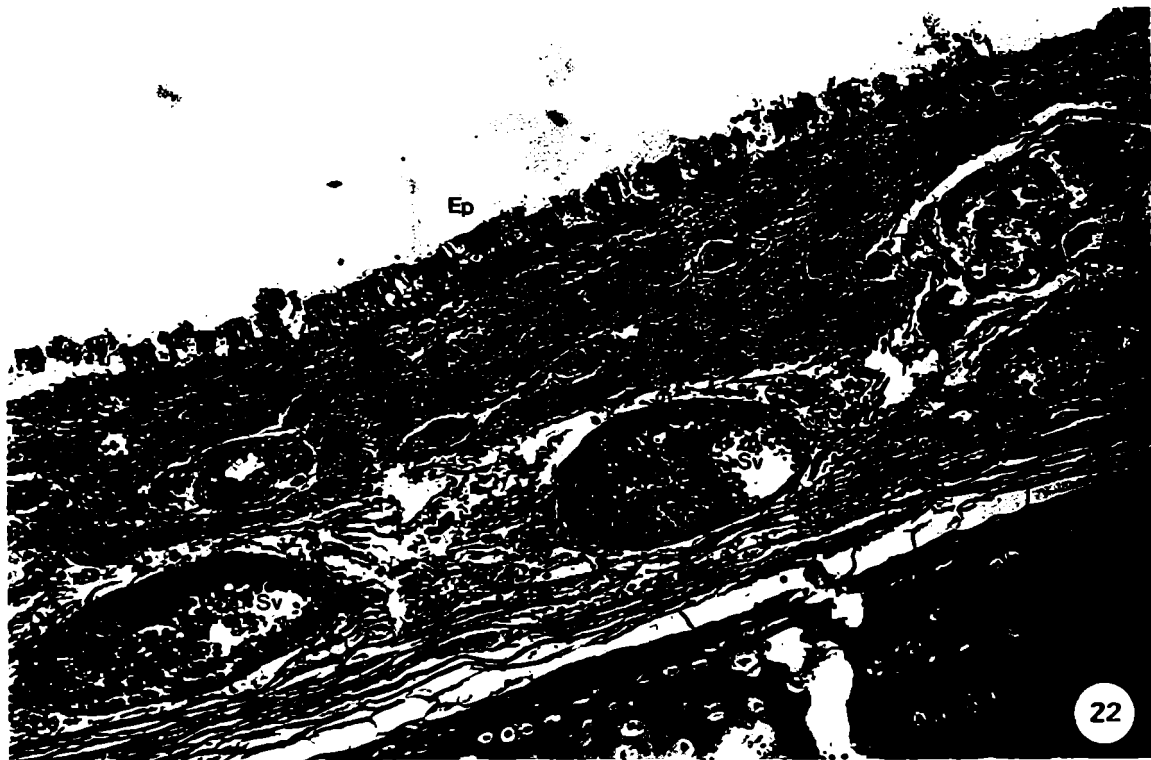


Figura 22: Mucosa y submucosa traqueal de *P.blainvillei*. At: adenómeros tubulares, Ep:Epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, Co: corion, Sv: senos venosos, Ct: cartílago (Coloración: Tricrómico de Masson) (Aumento: 250x)

Figura 23: Corte longitudinal de vía terminal de *O.flavescens*. Ct:: cartílago, Ep: epítlio cúbico (Aumento 250x)

Figura 24: Vía terminal de *P.blainvillei*. Se destaca la presencia de paquetes musculares (Pm). Ct: cartílago, Sa: saco alveolar (Aumento: 250x)

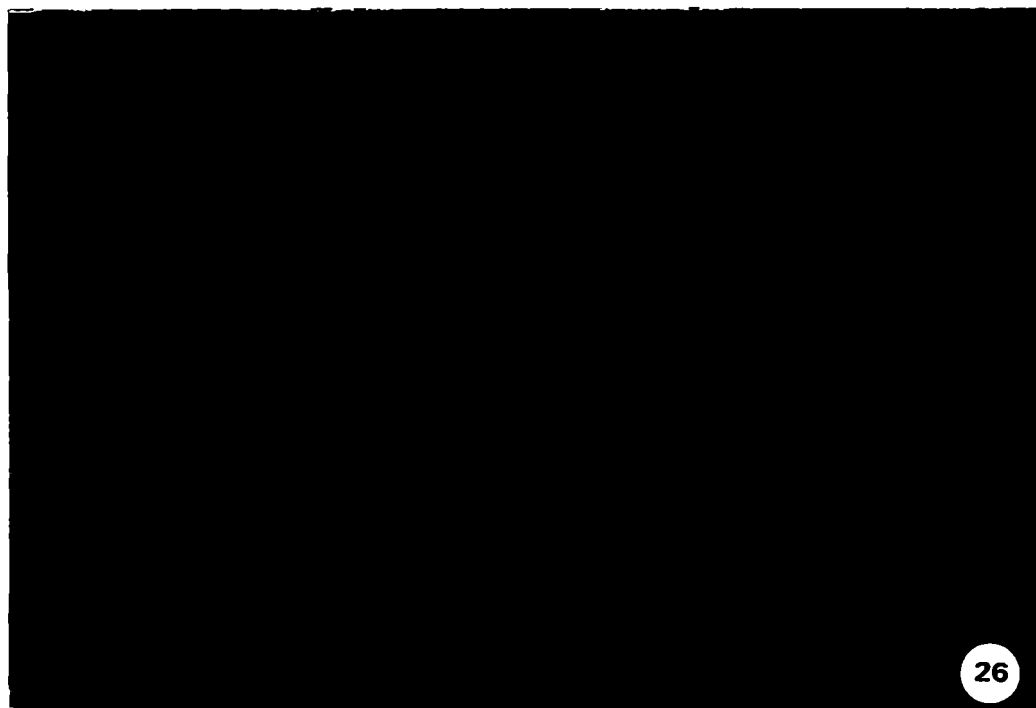
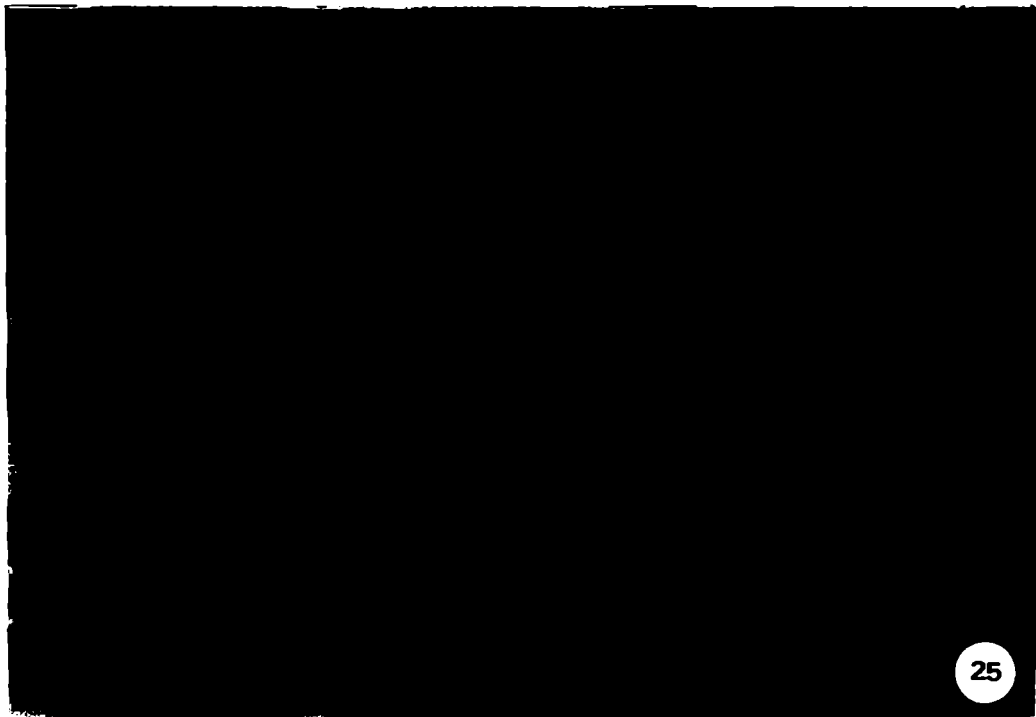


Figura 25: Sección semifina de parenquima alveolar de *O.flavescens*. **Tas:** tabique alveolar con lecho capilar simple. (Coloración: Azul de toluidina) (Aumento: 400x)

Figura 26: Sección semifina de parenquima alveolar de *O.flavescens*. **Tad:** tabique alveolar con lecho capilar doble. (Coloración: Azul de toluidina) (Aumento: 400x)

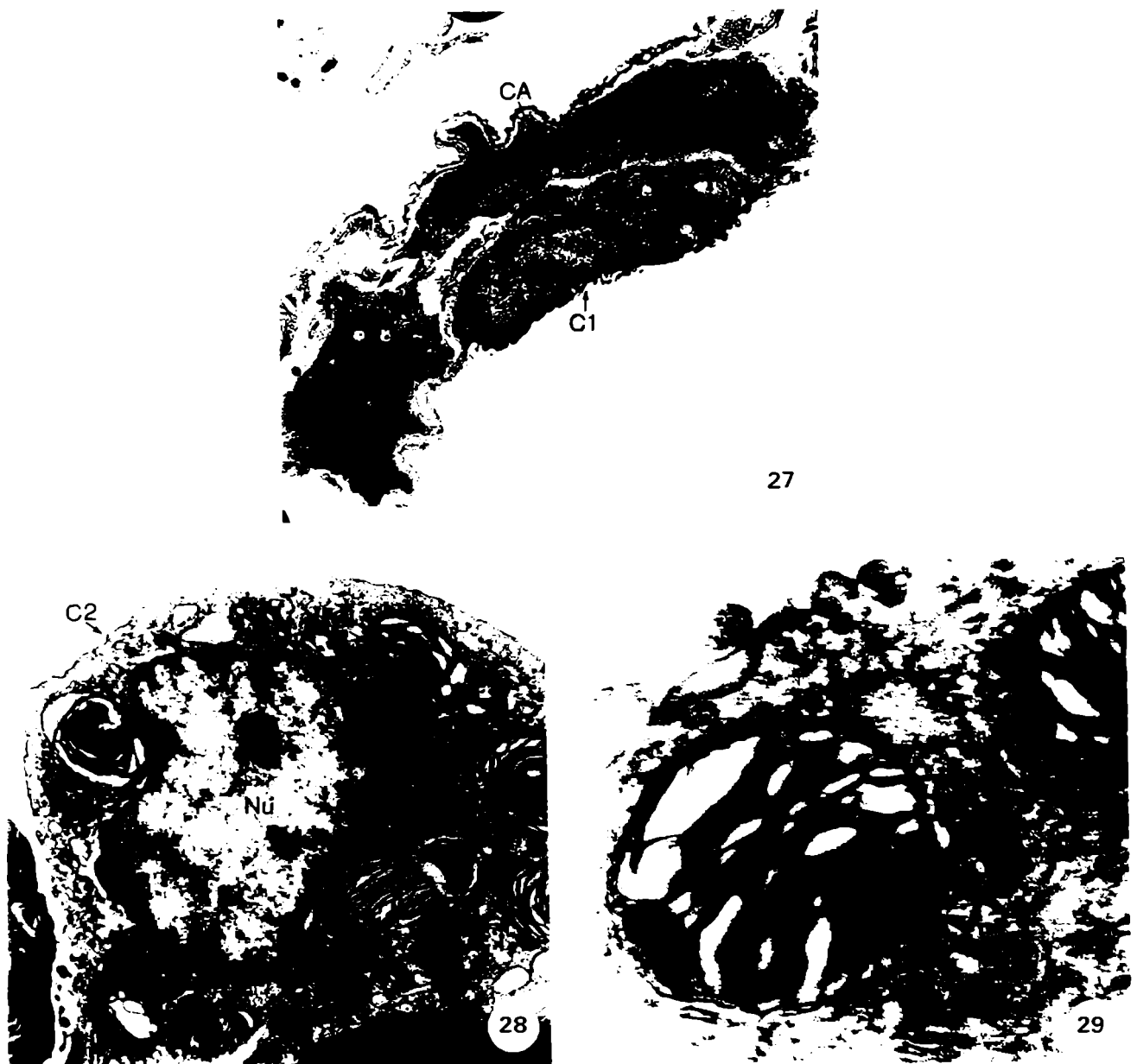


Figura 27: Corte fino (microscopía electrónica de transmisión). Detalle de pared alveolar. **C1:** célula alveolar escamosa tipo 1, **Nu:** núcleo, **CA:** capilar (Aumento: 6000 x)

Figura 28: Corte fino (microscopía electrónica de transmisión). Detalle de pared alveolar.,**C2:** Célula alveolar grande tipo 2, **CI:**cuerpos lamelares (o multilamelares), **Nu:** núcleo (Aumento: 12000 x)

Figura 29: Corte fino (microscopía electrónica de transmisión). Detalle de cuerpos lamelares (**CI**) de célula alveolar grande tipo 2. Se destaca la disposición laminar de los granulos de secreción, precursores del surfactante pulmonar (Aumento: 50000 x)

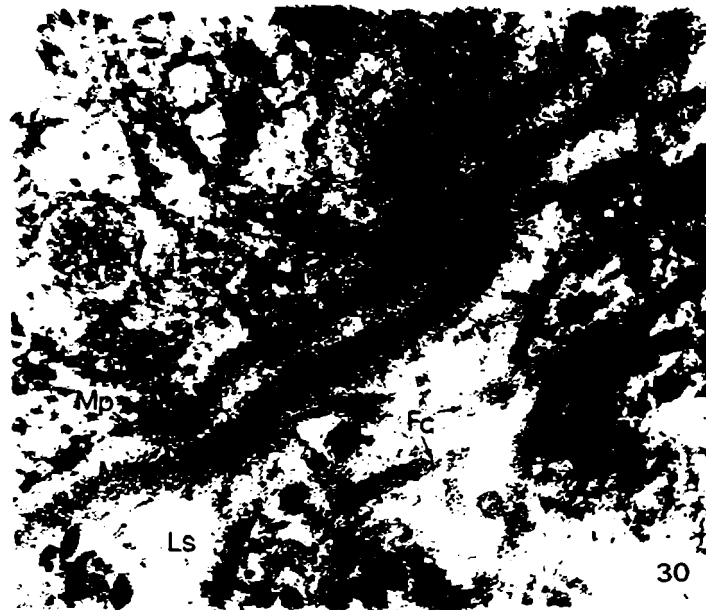


Figura 30: Corte fino (microscopía electrónica de transmisión) Detalle de epitelio traqueal, membrana basal y lámina subepitelial. **Fc:** fibras colágenas, **Ls:** lámina subepitelial, **Mb:** membrana basal (estrato lúcido y denso), **Mp:** membrana plasmática de células epiteliales (Aumento: 85.000 x).

Figura 31: Corte fino (microscopía electrónica de transmisión) Detalle de lámina subepitelial de la tráquea. **Fc:** fibras colágenas (nótese la disposición irregular de las fibras), **Ls:** lámina subepitelial (Aumento: 50000 x).

7.3.3 Discusión

La microanatomía de la tráquea y bronquios extrapulmonares mayores en las especies de mamíferos estudiadas en este trabajo, se corresponden con la del resto de los mamíferos terrestres.

No ocurre lo mismo con las vías aéreas de menor calibre por la existencia de diferencias desde el punto de vista histológico y de nomenclatura, dado la particular arquitectura pulmonar de este grupo. Los dos trabajos que abordan este tema en la foca de Weddell (*Leptonychotes weddelli*) (Boyd,1975; De Carlo y col.,1976) y el tercero que trata de la estructura y función de las vías aéreas menores en algunas especies de pinnípedos de la familia Phocidae y Otariidae (Denison y Kooyman,1973) muestran discrepancias, algunas basadas en interpretaciones histológicas, pero otras, producto de la nomenclatura que se adopta.

Coincidimos con De Carlo y col.(1976) y con Denison y Kooyman (1973) en considerar **lobulillo pulmonar** al parénquima alveolar limitado por tabiques de conectivo homologable al lobulillo primario de los mamíferos terrestres. En estos últimos, el lobulillo primario está alimentado por el bronquiolo terminal, por esta razón adoptamos la nomenclatura de vías aéreas menores o terminales para agruparlas.

Entre las vías aéreas menores o terminales y las mayores, se encuentra una serie de bronquios de distinto calibre que se ubican en los tabiques conectivos y que denominamos vías aéreas intermedias o interlobulillares. Dentro de este grupo, en los mamíferos terrestres, se incluyen a los bronquios interlobulillares y a los bronquios intralobulillares. El bronquio intralobulillar no se pudo definir en los mamíferos marinos, en el presente trabajo, por no existir un lobulillo secundario que los contenga, llevándonos por lo tanto a discrepar con Boyd (1975).

La nomenclatura clásica señala que el término bronquiolo debe adjudicarse a aquellas vías que carecen de cartílago, además de carecer de glándulas anexas, células calciformes y

poseer un epitelio cilíndrico o cúbico (Ham,1975; Weiss,1983; Ross y Romrell,1989) . Todas estas características se presentaron en las vías aéreas que abordan el acino, a pesar de poseer cartílago. Dado que el cartílago se interpreta como una adquisición secundaria de adaptación al buceo (capítulo 7.4), se considera en el presente trabajo que estas vías poseen características de **bronquiolo**.

Un rasgo notable de la histología de las vías aéreas mayores, es la presencia de la gruesa lámina subepitelial. Esta lámina se refiere como membrana basal en los textos de histología, lo que se comprueba que es erróneo en el presente trabajo. Las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas y la microscopía electrónica, demuestran que la membrana basal es del grosor típico de la que se encuentra en todos los tejidos. El engrosamiento debido a la lámina colágena subepitelial permite adjudicarle un papel importante en la resistencia a la compresión de la mucosa.

A pesar del soporte de cartílago la presión transmural en las vías aéreas, aumenta con el aumento de la presión externa, que es proporcional a la profundidad de buceo, y con la contracción de la capa muscular. Esto lleva a la formación de pliegues en la mucosa, que disminuyen la luz de la vía aérea. A mayor número de pliegues formados, menor será la disminución del área de la luz del tubo en cuestión y mayor será la presión necesaria para colapsarlo (Lambert,1991).

La lámina subepitelial subepitelial hace que la mucosa de estas vías aéreas desarrollen pliegues pequeños y numerosos, manteniendo por lo tanto la apertura de la vía aérea a pesar del aumento de presión. Esta característica es una ventaja para los animales buceadores, en los que las vías aéreas deben alojar el aire residual alveolar luego de la compresión de la caja torácica al sumergirse a profundidades considerables.

La existencia del corion elástico con la capa longitudinal de fibras elásticas muy gruesas contribuyen también a este proceso; puede adjudicarse a esta capa una segunda función que estaría representada por la contracción pasiva de las fibras elásticas para volver las vías aéreas a su largo normal, luego de la distensión operada al recibir el aire residual alveolar en la inmersión a profundidad.

En el corion glandular de las vías aéreas mayores de los pinnípedos, se encuentran muy desarrolladas las glándulas intramurales, las que disminuyen hasta desaparecer en las vías aéreas intermedias de menor calibre.

La complejidad y grado de desarrollo de las glándulas intramurales es menor en los cetáceos, lo que puede relacionarse con el modo de vida estrictamente acuático de estos últimos, a diferencia del hábito anfibio, con mayor contaminación ambiental, a que están sometidos los lobos marinos y las focas. En el delfín franciscana (*P. blainvillei*), a diferencia de lo observado por Yamasaki y col. (1977) que no observaron glándulas en las vías aéreas extrapulmonares, se destacó en las muestras analizadas en la presente Tesis la presencia de **glándulas tubulares** ramificadas en la tráquea y bronquios primarios. Patrones similares de distribución de glándulas a los observados en este trabajo, se repiten en otras especies de cetáceos (Wislocki, 1929; Simpson y Gardner, 1972; Fanning y Harrison, 1974).

La morfología de las glándulas de las vías aéreas superiores del sistema respiratorio de los pinnípedos estudiados, presentan además de los adenómeros tubulares, un seno glandular, ausente en los mamíferos terrestres descritos y en los cetáceos, pero presente también en otros pinnípedos: *Leptonychotes weddelli* (De Carlo y col., 1976) y en *Arctocephalus australis* (Lauria de Cidre y Crespo, 1991), lo que hace pensar que estas estructuras están comprometidas con el hábito anfibio de la especie.

El aporte original realizado en el presente trabajo, en relación a las glándulas presentes en las vías aéreas superiores, se refiere a: **a) Modalidades y tipo de secreción:** **1-** Consideramos que los senos glandulares muestran dos modalidades secretorias: una de tipo apócrino de proteoglicanos sulfatados y sialatados que se mantiene concentrada en el centro del lumen glandular tal vez debido a la alta viscosidad del producto de secreción, y otro de tipo merócrino de glicanos neutros, carboxilados y débilmente sulfatados. **2-** Los adenómeros tubulares, están formados por células merócrinas productoras de proteoglicanos neutros y carboxilados. **3-** A partir de 1 y 2 podemos concluir, que en esta especie, la síntesis de las mucinas típicas del sistema respiratorio se encuentran compartimentalizadas en distintas porciones del aparato glandular.

b) Morfología funcional de las células glandulares: 1-Las células planas o cuboides de los senos glandulares corresponderían a estados en reposo o de incipiente actividad de síntesis respectivamente, mientras que las cúbicas altas, representarían el estado de maduración. 2- Las células de los adenómeros tubulares de núcleos esféricos con escasas vesículas claras, propias de las células mucosas, representarían estados de incipiente actividad de síntesis. Aquellas con núcleos ovoides o planos y alta densidad de vesículas citoplasmáticas, corresponderían a estados maduros en la síntesis de proteoglicanos. **c) Células mioepiteliales:** Las células mioepiteliales en el león marino sudamericano (*O. flavescens*), son de tipo banda, sin guardar relación con el diámetro de los túbulos que revisten. Su disposición regular inducen a pensar en una función mecánica para vehiculizar la secreción hacia el conducto excretor. **d) Relación con el sistema inmune asociado a las mucosas:** La presencia de células plasmáticas en íntima relación con los adenómeros glandulares, indicarían que éstos juegan un importante rol en el denominado sistema inmune asociado a las mucosas.

Las capas musculares continuas y de espesor constante en los pinnípedos, contrastó con la compartimentalizada de los cetáceos en las vías aéreas terminales, que aparecieron constituyendo **esfínteres mioelásticos**. Esto último se contrapone con lo citado por Yamasaki y col.(1977) para el delfín franciscana (*P.blainvillei*). Estos autores no hallaron estructuras similares a esfínteres en los bronquiolos terminales (la discusión sobre sus implicancias funcionales será tratado en detalle en el capítulo 7.5).

Se destaca finalmente la presencia de cartílago en forma de placas irregulares, en las vías aéreas terminales de las especies estudiadas, hasta la desembocadura en la región alveolar.

PARTE 2

**ANÁLISIS MORFOLÓGICO E IMPLICANCIAS
FUNCIONALES DE DOS CARACTERÍSTICAS
SOBRESALIENTES DE LAS VÍAS AÉREAS:**

**El cartílago de las vías terminales y los esfínteres
bronquiales.**

7.4 ESTUDIO DEL DESARROLLO POSTNATAL DEL CARTÍLAGO EN VÍAS AÉREAS TERMINALES DE *Otaria flavescens*.

7.4.1 Introducción

La presencia del cartílago en las vías terminales de los pinnípedos se conoce desde hace 100 años aproximadamente, pero su rol funcional todavía es poco claro.

Scholander (1940), propuso que el reforzamiento de las vías terminales en los pulmones de la mayoría de los mamíferos marinos, facilitaría la salida del aire desde los sacos alveolares hacia el espacio aéreo muerto, como consecuencia del aumento de la presión externa durante la inmersión. Este mecanismo prevendría al animal de un elevado pasaje de nitrógeno a sangre.

Denison y Kooyman (1973), a través de estudios llevados a cabo en pulmones de pinnípedos sugieren que dicho reforzamiento terminal es una adquisición secundaria, lo que implica que el cartílago en las vías terminales aparecería en los fetos a término o durante la época neonatal. Estos autores mencionan que en un cachorro de unos pocos meses de vida, los anillos cartilaginosos terminales están presentes, pero no completamente maduros.

Drabek y Kooyman (1983) describieron que los cachorros de *Eumetopias jubatus* (otárido) en sus últimas semanas de gestación, todavía no presentan un cartílago tan desarrollado como el del adulto.

¿Existe un desarrollo gradual del cartílago de las vías aéreas terminales que finaliza antes de iniciar las primeras incursiones subacuáticas?; o, ¿el cartílago se presenta inmaduro mas allá del inicio de la actividad subacuática?.

En este capítulo se presenta el primer estudio sobre el desarrollo postnatal del cartílago terminal, durante el primer mes de vida, hasta que los cachorros inician sus primeras actividades acuáticas.

7.4.2 Resultados

7.4.2.1 Histología general de las vías aéreas terminales

El pulmón del cachorro recién nacido (menos de una hora de vida) presentó un estadio sacular, caracterizado por la presencia de sacos alveolares con pocos alvéolos desarrollados completamente (Figura 1). El largo promedio de estos sacos alveolares fue de 325 μm .

En los tabiques conectivos intersaculares, se encontraron ubicadas las vías aéreas interlobulillares. Se observó el característico epitelio cilíndrico alto y ciliado, la túnica fibroelástica con la capa de musculo liso, las placas de cartílago y la adventicia que se continúa con el conectivo del tabique. En las proximidades de los sacos alveolares, se identificaron las vías terminales revestidas por un epitelio cilíndrico bajo a cúbico, túnica fibroelástica delgada, las placas de cartílago y una delgada adventicia.

La ubicación y caracterización general de las vías aéreas se mantuvo en los ejemplares de todas las edades estudiadas y se realizó mediante el análisis de preparaciones histológicas coloreadas con la técnica de Masson.

7.4.2.2 Histogénesis del cartílago de las vías aéreas terminales

El estudio de los bloques de cartílago de las vías aéreas se llevó a cabo analizando la presencia de los glicosaminoglicanos, sulfato de condroitina y sulfato de keratán altamente sulfatados, que forman el proteoglicano agregacán, constituyente mayoritario de la matriz extracelular (ME) del cartílago.

Dado que el estado de máxima sulfatación, se observa en los cartílagos maduros, mientras que en los cartílagos jóvenes el grado de sulfatación de este proteoglicano es menor,

se pudo determinar el grado de madurez de este tejido mediante el análisis de la morfología tisular con las técnicas histológicas de rutina, y mediante la determinación del grado de sulfatación con las técnicas de azul de alcian en soluciones de distinto pH.

Trabajando a pH 2,5 o mayores se identificaron proteoglicanos cuyas cargas negativas provienen de grupos sulfatos o carboxilos, mientras que a pH 1, solamente los grupos sulfatos quedan expuestos y reactivos. De acuerdo con esto se pudo observar en los bloques de cartílago de las vías aéreas interlobulillares del recién nacido, la presencia de condrocitos aislados o en grupos de no más de 2 células. La ME es escasa y azul de alcian pH 2,5 positiva. El azul de alcian pH 1 solo presentó reacción positiva en la periferia de las células (Tabla 1). En estos bloques se encontró un pericondrio formado por 2 capas de condroblastos (Figura 2).

Los bloques de cartílago de las vías aéreas terminales en contacto con los sacos alveolares presentaron menos ME que la observada en el cartílago de las vías interlobulillares, y solo mostraron reacción positiva al azul alcian pH 2,5 en la periferia de las células. Éstas estaban muy compactadas, no pudiendo registrarse grupos isogénicos. Los citoplasmas se vieron homogéneos, sin vacuolas y los núcleos turgentes con nucleolo desarrollado (Figura 3). El pericondrio presentó también 2 capas de condroblastos.

Se observaron pocos cambios histológicos en las placas de cartílago en las vías aéreas interlobulillares y terminales de los cachorros de 2 hasta 17 días de edad. Los sacos alveolares se vieron mas expandidos, con un largo promedio de 390 μm , y con una menor cantidad de tejido intersticial en los tabiques alveolares. El pericondrio del cartílago en vías las interlobulillares mostró un grado mayor de desarrollo, pudiéndose distinguir 2 capas: una interna formada por dos láminas de condroblastos o capa condrógena y una externa rica en fibras colágenas y fibroblastos, o capa fibrosa. Estos bloques de cartílago presentaron mayor cantidad de ME, especialmente en el cachorro de 17 días de edad, solamente coloreable con azul de alcian pH 2,5. En los bloques de cartílago de las vías terminales la ME continuó siendo escasa, con una reacción positiva al azul alcian pH 2,5, y con solo reacción positiva al azul de alcian pH 1 restringida a la periferia de las células.

En los cachorros de 22 días de edad, el aspecto del parénquima alveolar fue mas similar al del adulto (Figura 4). Los sacos alveolares presentaron un largo promedio de 470 μm , mientras que en los ejemplares adultos este largo alcanzó un valor promedio de 790 μm .

Sin embargo, las placas de cartílago de las vías interlobulillares todavía mostraron escasa cantidad de ME en estos cachorros, al igual que en los cachorros de 17 días. La reacción positiva al azul de alcian pH 1 seguía observándose sólo en la periferia de los condrocitos. Cabe destacarse que los condrocitos en estas placas, se caracterizaron por tener un aspecto mas maduro, con formas mas esféricas, un núcleo excéntrico con cromatina condensada y vacuolas citoplasmáticas (Figura 5). En las vías terminales de estos cachorros, las placas de cartílago ofrecieron un aspecto muy inmaduro, caracterizado por escasa ME, condrocitos muy compactados, reacción positiva al azul alcian pH 1 solo en la periferia de los condrocitos y un pericondrio con una capa condrógena bien desarrollada (Figura 6).

El aspecto del cartílago de los bronquios terminales en el cachorro de 22 días de edad, es muy diferente al observado en el adulto, en donde se observó una elevada cantidad de ME, la presencia de grupos isogénicos de condrocitos, reacción positiva al azul de alcian pH 1 en la ME (tabla 1), además de la cápsula, y un pericondrio predominantemente fibroso (Figura 7).

7.4.2.3 Morfometría del cartílago en las vías aéreas terminales

Los estudios realizados con el analizador digital de imágenes, en las placas de cartílago de las vías aéreas interlobulillares de los distintos estadios de los cachorros no arrojaron diferencias significativas con las del adulto.

Los resultados fueron distintos, al analizar las placas de las vías aéreas terminales. Se comprobó un decrecimiento significativo (ANOVA, contraste de Bonferroni, $p < 0,05$) de la

relación entre el área total de la placa de cartílago de la vía aérea terminal y el área ocupada por la ME comparando las del cachorro recién nacido y las de cachorros de hasta 22 días de vida, con el adulto (Figura 8).

Este resultado fue corroborado analizando la relación entre el área total de la placa y el área ocupada por los condrocitos, que fue significativamente mayor (ANOVA, contraste de Bonferroni, $p < 0,05$) en los adultos respecto de las crías (Figura 8).

Los volúmenes individuales de los condrocitos, estimados a partir de las áreas de sección medidas en cada célula no mostraron diferencias significativas entre las crías y adultos, si bien los valores arrojaron una tendencia al aumento de volumen en los condrocitos de los adultos.

Finalmente, la relación entre el área ocupada por la ME y el área de los condrocitos en cada bloque de cartílago de las vías terminales fue significativamente mayor (ANOVA, contraste de Bonferroni, $p < 0,05$) en los adultos que en las crías (Figura 8), reforzando la apreciación cualitativa extraída de la observación de las preparaciones histológicas al microscopio óptico, respecto del incremento de la ME. A este respecto cabe señalar también la tendencia al aumento de la ME observada en los cachorros de 22 días respecto del cachorro recién nacido.

7.4.2.4 Aspectos generales del comportamiento de buceo en los cachorros

En los estudios a campo llevados a cabo en Punta Norte durante la época reproductiva de esta especie, se observó que los cachorros del lobo marino sudamericano (*O. flavescens*) presentaron muy escasa actividad acuática durante el primer mes de vida. Esta actividad se caracterizó por durar unos pocos minutos y llevarse a cabo a menos de 200 metros de la costa. Se observó también que la "actividad acuática" más frecuente en los cachorros no mayor de un mes de edad, consistía en sumergir la cabeza durante unos segundos a modo de "inmersión" en los piletones de agua que se formaban entre las rocas de la costa durante la bajamar.

Sólo un cachorro, de menos de un mes de edad, extendió su actividad acuática (natación e inmersiones cortas) por más de 50 minutos durante las dos temporadas de observación. La actividad desarrollada durante las incursiones marinas era generalmente la misma: natación superficial, con la cabeza fuera del agua y con esporádicas inmersiones que no excedían los 10 segundos.

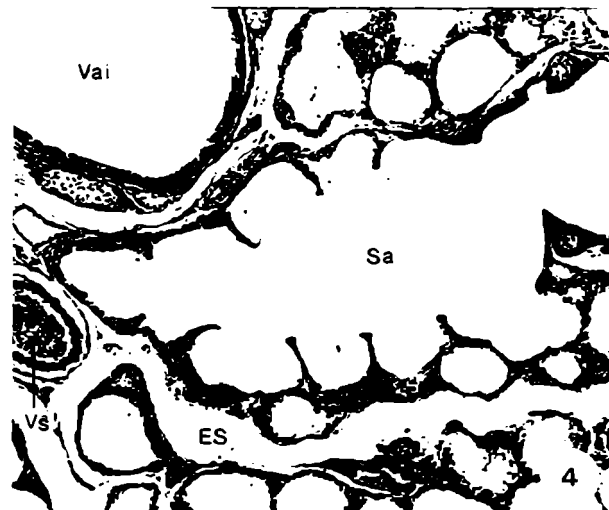
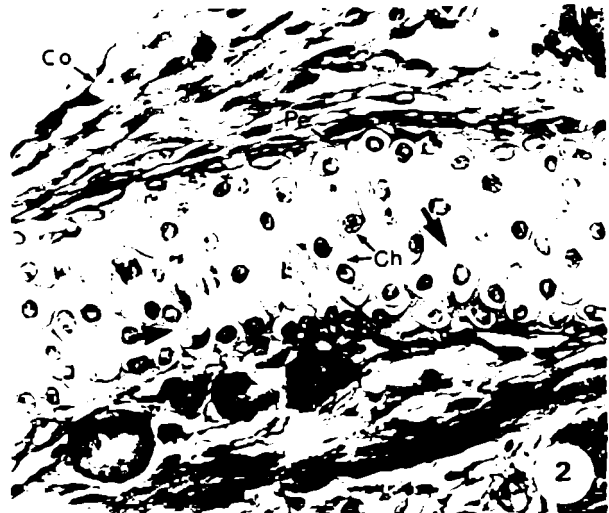


Figura 1: Parénquima pulmonar en el recién nacido. **Es:** estroma, **Sa:** saco alveolar (Aumento: 100x)

Figura 2: Cartílago de bronquio interlobulillar en el recién nacido. **Ch:** condrocito, **Co:** tejido conectivo, **Pe:** pericondrio, **flecha:** matriz extracelular (Aumento: 400x)

Figura 3: Cartílago de bronquiolo terminal en el recién nacido. **Ch:** condrocito, **Ep:** epitelio simple cubico, **Pe:** pericondrio, **flecha:** matriz extracelular (Aumento: 400x)

Figura 4: Parénquima pulmonar en el cachorro de 22 días. **Es:** estroma, **Sa:** saco alveolar, **Vai:** vía aérea interlobulillar, **Vs:** vaso sanguíneo (Aumento: 100x)

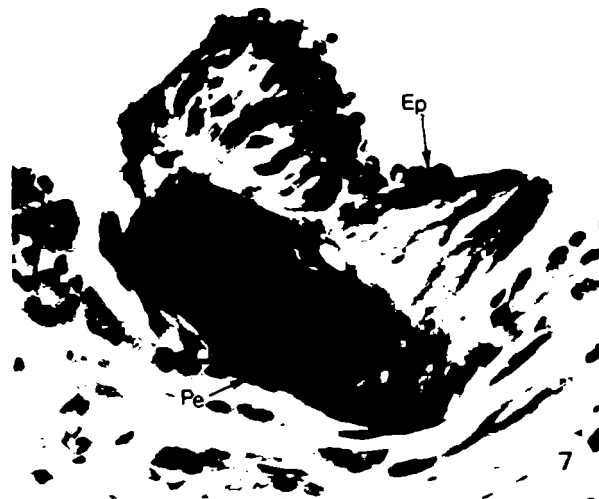


Figura 5: Cartílago de bronquio interlobulillar en el cachorro de 22 días. **Ch:**condrocito, **Co:**tejido conectivo, **Pe:**pericondrio, **flecha:**matriz extracelular (Aumento: 400x)

Figura 6: Cartílago de bronquiolo terminal en el cachorro de 22 días. **Ch:**condrocito, **Ep:**epitelio simple cubico, **Pe:**pericondrio, **flecha:**matriz extracelular (Aumento: 400x)

Figura 7: Cartílago de bronquiolo terminal en el adulto. **Ch:**condrocito, **Ep:**epitelio simple cubico, **Pe:**pericondrio, **flecha:**matriz extracelular (Aumento: 400x)

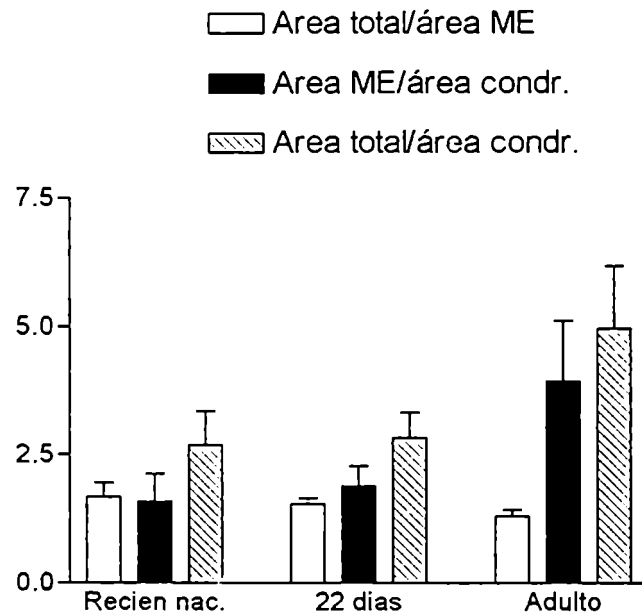


Figura 8: Variables morfométricas del cartílago en vías aéreas terminales en cachorros y adulto ($n = 30$, Test de Anova con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, $p < 0,05$ entre adultos vs. recién nacidos y cachorros de 22 días). **Área total:** área total de la placa de cartílago, **Área ME:** área de la matriz extracelular de la placa de cartílago, **Área condr.:** área total ocupada por los condrocitos de la placa de cartílago.

Tabla 1: Alcianofilia de la matriz extracelular (ME) en los bloques de cartilago de vías las interlobulillares y terminales de los cachorros y del adulto del lobo marino sudamericano (*O. flavescens*).

EDAD	ABUNDANCIA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LOS BLOQUES DE CARTILAGO		ALCIANOFILIA EN LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LOS BLOQUES DE CARTILAGO	
	VIA AEREA INTERLOB.	VIA AEREA TERMINAL	VIA AEREA INTERLOB. pH: 1 pH:2,5	VIA AEREA TERMINAL pH: 1 pH: 2,5
RECIENTE NACIDO	++	+	- +	- +
2 - 17 DIAS	+++	+	- +	- +
22 DIAS	+++	++	+ ++	- ++
ADULTO	++++	++++	+++ +++++	+++ +++++

Las intensidades de coloración están basadas en una escala subjetiva que abarca desde valores negativo (-) hasta muy positivo (++++).

INTERLOB: Interlobulillar.

7.4.3 Discusión

A partir de los estudios histológicos e histoquímicos, se pudo observar que las placas de cartílago de las vías aéreas interlobulillares de los cachorros hasta 22 días de vida presentaron un contenido de proteoglicanos sulfatados inferior a los equivalentes del adulto. Sus células mostraron la morfología de los condrocitos jóvenes (Weiss, 1983), y solamente las cápsulas por ellos sintetizada presentó reacción positiva al azul de alcian pH 1, indicando la presencia de agregan.

De todas maneras, **los estudios morfométricos mostraron que la cantidad de ME del tejido cartilaginoso en las vías interlobulillares es inferior a la del adulto y conjuntamente con la presencia de un pericondrio activo, indica la presencia de un cartílago joven.**

A diferencia de las vías interlobulillares, las vías aéreas terminales presentaron una menor alcianofilia en la ME hasta los 22 días de edad. Sus células se encuadraron en la morfología del condroblasto, lo que permite aseverar que este tejido se encuentra más cercano a la etapa de precartílago.

La morfometría de las placas de cartílago en las vías terminales de los cachorros y adultos apoyaron los resultados histológicos obtenidos. Estos demostraron que el área total de la placa en relación al área ocupada por ME disminuye significativamente desde el cachorro de 22 días hasta la edad adulta. Así mismo existen variaciones significativas en relación a la cantidad de ME y el área ocupada por condrocitos, y la relación entre el área total de la placa terminal y el área total ocupada por condrocitos. Estos resultados ponen de manifiesto **la inmadurez del cartílago terminal de los cachorros durante el primer mes de vida.**

Los resultados obtenidos en esta Tesis apoyan la hipótesis planteada por Denison y Kooyman (1973), que enuncia que el cartílago de las vías terminales correspondería a una adquisición secundaria, asociada con su posible rol funcional.

Las interpretaciones funcionales del cartílago en las vías aéreas terminales pueden resumirse en dos ítems:

a) a grandes profundidades (> 50 mts) la presión externa aumenta, lo que provoca el colapso casi simultáneo de la región alveolar y las vías terminales. El colapso de estas vías impediría la salida del aire alveolar, pudiendo así continuar la hematosis durante el buceo, con el costo asociado de elevar los niveles de nitrógeno en sangre. El reforzamiento de cartílago en las vías terminales permitiría la salida del aire alveolar durante los buceos profundos, provocando la interrupción del intercambio gaseoso. El costo de eliminar el oxígeno de reserva se compensaría con el beneficio de evitar el pasaje elevado de nitrógeno a la sangre, inhibiendo así la narcosis (Scholander, 1940).

b) el reforzamiento terminal sería necesario para facilitar flujos aéreos rápidos a pesar de los bajos volúmenes de aire pulmonar que manejan algunas especies durante la espiración en superficie (Denison y Kooyman, 1973).

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, ¿cómo es posible que el cartílago de las vías aéreas terminales no complete su maduración cuando comienzan los hábitos acuáticos, si ambas hipótesis funcionales lo asocian a actividades acuáticas?

Probablemente la respuesta pueda encontrarse al analizar el tipo de buceo que realizan las crías durante los primeros meses de vida.

Durante la temporada reproductiva, las hembras del león marino sudamericano (*O. flavescens*) desarrollan viajes de alimentación al mar que pueden extenderse por varios días, mientras que los cachorros permanecen en tierra. **La escasa actividad acuática registrada en los cachorros durante el primer mes de vida, permite plantear que el tipo de buceo desarrollado por los cachorros y probablemente por los juveniles del león marino sudamericano se presentan también “inmaduros” en relación al buceo de los adultos.**

Estudios sobre la ontogenia del buceo en distintos pinnípedos confirman estas diferencias registradas en *O. flavescens*.

En las hembras del lobo marino de las Galapagos (*Arctocephalus galapagoensis*), se observó un incremento de los tiempos y profundidades de buceo, desde 0,8 minutos y 5,6 metros en crías de 6 meses de edad, hasta buceos de 4,47 minutos y 106 metros en los adultos (Horning, 1993). Los crías de la *Phoca hispida* presentaron buceos superficiales de corta duración (Lydersen y Hammill, 1993); y cerca del 80 % del tiempo total que permanecen en el agua lo pasan en la superficie, mientras que los adultos de esta especie pasan en la interfase agua-aire solo un 16,6 % (Lydersen, 1991). En las crías de la foca monje del Mediterráneo, *Monachus monachus*, se presenta una ontogenia del buceo similar, con un mayor porcentaje de tiempo en la superficie del agua y con inmersiones de corta duración. Más aún, en esta especie se observó un desarrollo o aprendizaje en el tipo de buceo en relación a distintas edades de las crías estudiadas (Gazo y Cappozzo, 1996).

Finalmente cabe preguntarse, **¿la madurez del cartílago terminal se desarrolla en forma gradual, asociada con cambios también graduales en el comportamiento de buceo?, o ¿la madurez del cartílago terminal queda detenida hasta que determinados cambios en los patrones de buceo gatillan la finalización del desarrollo tisular?**

Estas preguntas, por el momento no tienen respuesta debido a la falta de estudios sobre la ontogenia del buceo durante el primer año de vida, asociados con estudios histológicos de las vías terminales en estas especies.

7.5 ESTUDIO COMPARADO DE LOS ESFÍNTERES MIOELÁSTICOS EN EL DELFIN FRANCISCANA, *Pontoporia blainvillei* Y EN EL DELFIN OSCURO *Lagenorhynchus obscurus*.

7.5.1 Introducción

A principios de este siglo, se describieron los esfínteres mioelásticos en las vías terminales de los pulmones de algunas especies de cetáceos. Wislocki (1929) planteó la existencia de estos esfínteres en la tonina (*Tursiops truncatus*), en bronquiolos menores a 0,5 mm. de diámetro, capaces de contraerse y ocluir toda la vía.

Generalmente los esfínteres se distribuyen entre las placas de cartílago, y están compuestos principalmente por fibras de músculo liso circulares, entre las cuales se presentan fibras elásticas radiales que pueden ramificarse y conectar las fibras musculares internas y externas del esfínter.

Baudrimont (1929) describió histológicamente los esfínteres, señalando la presencia de fibras musculares asociadas con fibras colágenas y fibras elásticas radiales. Fanning y Harrison (1974), realizaron una breve descripción ultraestructural de los mismos. Pero más allá de su caracterización histológica, llamó la atención desde un comienzo (ver 4.2) su distribución en determinados cetáceos: *Phocaena phocaena*, *Tursiops truncatus*, *Delphinus delphis*, *Delphinapterus leucas*, *Berardius bairdii*, *Stenella attenuata*, *Stenella longirostris*. Goudappel y Slijper (1958) agruparon a estas especies en una categoría denominada "pequeños cetáceos". Estos autores plantean que la presencia de esfínteres no estaría asociada a factores sistemáticos, sino que se relacionaría con patrones de actividad.

La presencia diferencial de los esfínteres mioelásticos, sumada a los distintos patrones de actividad de buceo de cada especie, permitió el desarrollo de diferentes hipótesis funcionales para estas estructuras. Drabek y Kooyman (1983), resumieron las principales

proposiciones funcionales planteadas durante este siglo. A todas estas hipótesis se las puede separar en dos grupos:

a) aquellas que sostienen que los esfínteres permitirían retener el aire en los alvéolos para facilitar el intercambio gaseoso durante los buceos (Fiebiger, 1916; Baudrimont, 1956); y b) la que postula que los segmentos que poseen esfínteres regularían los cambios de presión durante los movimientos verticales, y también facilitarían el movimiento de aire durante los elevados picos de velocidad en la espiración (Goudappel y Slijper, 1958; Wislocki y Belanger, 1940; Kooyman y Andersen, 1969; Fanning, 1979).

La mayoría de estas hipótesis funcionales no tienen un sustento experimental directo. Es evidente que frente a la imposibilidad de estudios fisiológicos directos, la respuesta funcional mas aproximada para estas estructuras podría encontrarse en estudios estructurales comparados mas específicos, en relación con estudios de los patrones de ventilación y buceo de cada especie.

7.5.2 Resultados

7.5.2.1 Esfínteres mioelásticos en el delfín franciscana (*P. blainvillei*)

Las vías aéreas terminales presentaron un diámetro que osciló entre 1 y 0,3 mm. En el delfín franciscana (*P. blainvillei*) las vías menores de 1 mm de diámetro están revestidas por un epitelio que transcurre desde cilíndrico pseudoestratificado ciliado a cilíndrico ciliado. El corion es delgado, y en él se distinguen núcleos de fibrocitos y linfocitos inmigrantes, y fue característica la presencia de vasos sanguíneos subepiteliales con marcada vasodilatación.

A partir de vías de 0,5 mm de diámetro, aparecieron los primeros esfínteres ubicados en el corion; externamente a ellos se disponen las placas de cartílago y la túnica adventicia.

Los esfínteres están formados en promedio por 3 capas de fibras de musculares lisas que se disponen en forma circular; y se observan también al microscopio óptico con la técnica de Rubens Duval, la presencia de fibras elásticas en disposición radial.

Si bien todos los esfínteres son de un espesor semejante varían en su longitud, presentándose en cortes longitudinales de las vías aéreas, como paquetes pequeños y compactos o franjas irregulares (Figura 1). En estos cortes se determinó que los espesores promedios de la musculatura que forma el esfínter fue de 0,05 mm., mientras que su longitud osciló entre 0,1 y 0,2 mm. (Figura 2).

Los esfínteres, en una misma vía, se disponen en forma secuencial separados por una corta distancia (0.96 mm. promedio). Fue difícil determinar el número de esfínteres en una vía aérea de una misma generación, dado su irregularidad, pero el estudio cuidadoso de los cortes seriados permitió estimar que el número promedio es de 6. La longitud promedio de esta vía terminal pudo estimarse en 0,8 mm.

Cuando las vías terminales alcanzan un diámetro de 0,3 mm, encontrándose próximas a su finalización, llamó la atención el nacimiento en posición lateral de sacos alveolares. Estos sacos laterales en su entrada están provistos de un esfínter, el que podría diferenciarse como un esfínter presacular.

El análisis de unos 200 cortes seriados reveló que los esfínteres mioelásticos en *P.blainvillei* se distribuyen a lo largo de varias generaciones de vías terminales, pero predominan en densidad en aquellas vías terminales que desembocan en sacos alveolares (Figura 6). En las primeras vías solo se observaron 1 ó 2 esfínteres secuenciales, sin embargo en las últimas vías el número osciló entre 5 y 9.

7.5.2.2 Esfínteres mioelásticos en el delfín oscuro (*L.obscurus*)

En el delfín oscuro (*L.obscurus*) el epitelio de las vías menores fue difícil de determinar debido a que las condiciones de muestreo no fueron óptimas para permitir los estudios

histológicos. Se pudo observar un epitelio cilíndrico a cúbico alto en algunas vías menores de 0,4 mm. de diámetro.

El corion se presentó compacto y escaso, con vasos sanguíneos de distinto calibre. También se observó el desarrollo ya característico de pequeñas placas de cartílago en estas vías terminales. Los esfínteres mioelásticos aparecen en las vías aéreas de 0,4 mm de diámetro promedio y su desarrollo es notable en esta especie (Figura 3). El espesor de la capa muscular es de 0,2 mm, cubriendo una longitud de 0,1 mm de la vía aérea. La distribución de los esfínteres se presentó en forma muy regular, desarrollándose una ordenación espacial constante (Figura 3). Entre esfínteres contiguos, se observó la presencia de placas de cartílago en el corion externo. Debido a la ordenación espacial de los esfínteres a lo largo de las vías, se pudo determinar que la distancia existente entre ellos oscila alrededor de los 0,25 mm.

A continuación de la aparición del primer esfínter, la vía se ramifica, en algunos casos en ángulo recto a la vía troncal. A pesar de la dificultad para determinar mediante cortes seriados la longitud de la vía terminal con esfínteres de una misma generación, esta pudo estimarse en 0,75 mm.

Como se señaló para el delfín franciscana, en el delfín oscuro también se desarrollaron sacos alveolares a lo largo de la vía terminal previo a su finalización. Estas saculizaciones también se encuentran precedidas por un esfínter.

Una de las características sobresalientes de los esfínteres en el delfín oscuro, es que generalmente aparecen ocluyendo la vía terminal (Figura 4); esto no se observó en el delfín Franciscana (Figura 5).

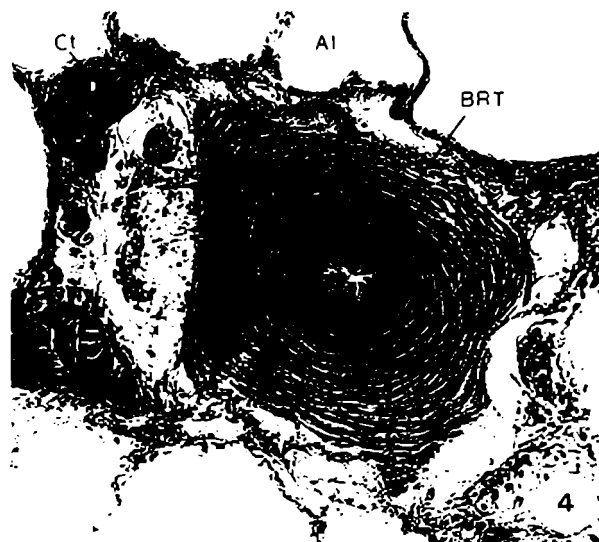
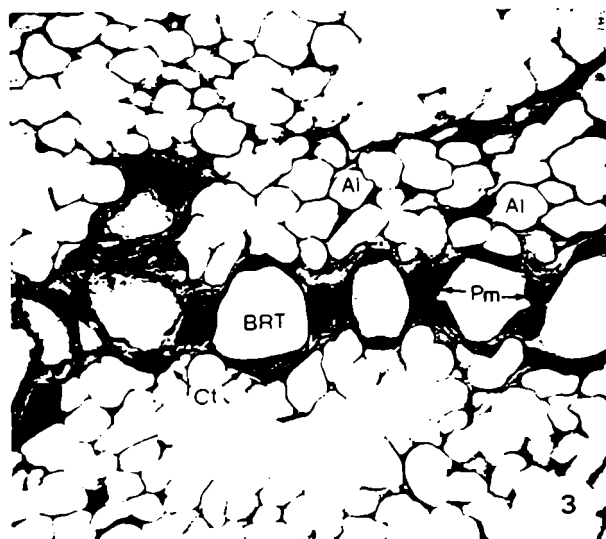
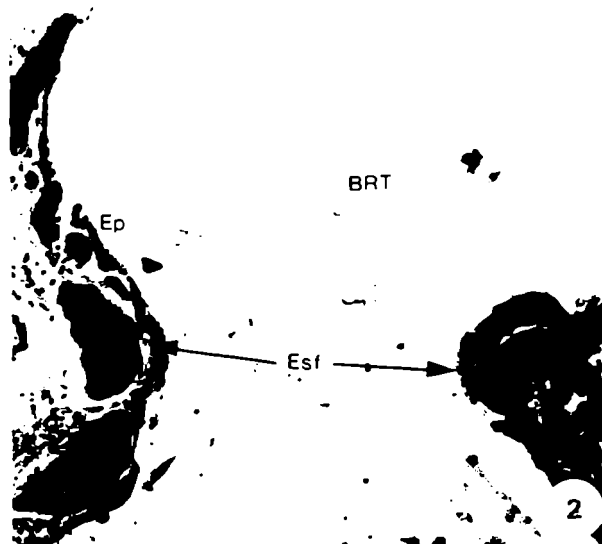
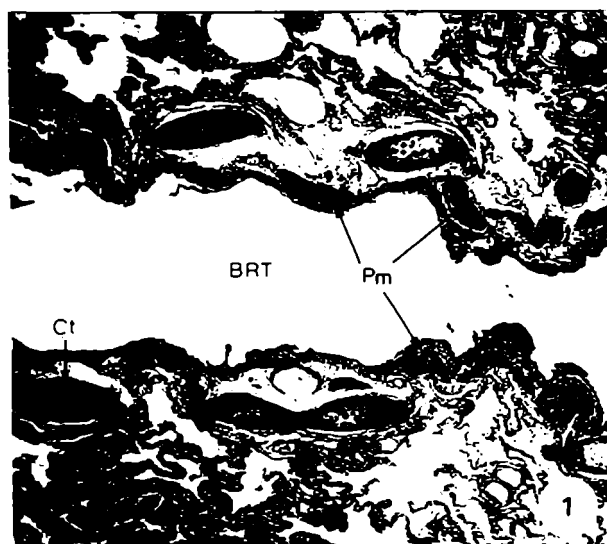


Figura 1: Bronquiolo terminal del delfín franciscana (*P. blainvillei*). **BRT:**bronquiolo terminal, **Ct:**cartilago, **Pm:**paquetes musculares (esfínteres) (Aumento: 100x)

Figura 2: Detalle de bronquiolo terminal del delfín franciscana (*P. blainvillei*), en donde se destacan los paquetes musculares correspondientes a un esfínter. **BRT:**bronquiolo terminal, **Esf:** esfínter, **Ep:**epitelio simple cubico (Aumento: 400x)

Figura 3: Bronquiolo terminal del delfín oscuro (*L. obscurus*). **BRT:**bronquiolo terminal, **Ct:**cartilago, **Pm:**paquetes musculares (esfínteres), **Al:**alvéolo (Aumento: 100x)

Figura 4: Corte transversal del bronquiolo terminal del delfín oscuro (*L. obscurus*) (corte transversal), donde se destaca la oclusión de la vía por la contracción del esfínter.**BRT:**bronquiolo terminal, **Ct:**cartilago, **Esf:**esfínter , **Al:**alvéolo (Aumento: 400x)

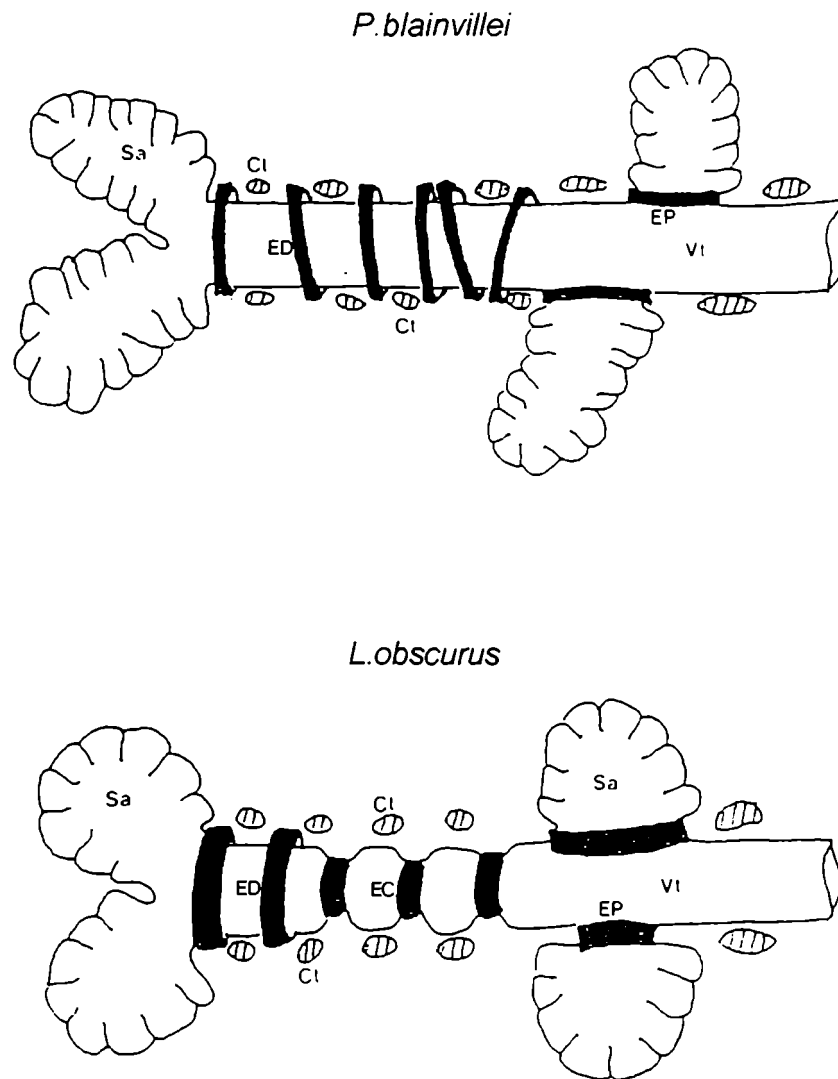


Figura 5: Esquemas de vías terminales del delfín franciscana (*P. blainvillei*) y del delfín oscuro (*L. obscurus*). **Ct:** cartilago, **EP:** esfínter presacular, **EC:** esfínter contraído, **ED:** esfínter distendido, **Sa:** saco alveolar, **Vt:** vía terminal.

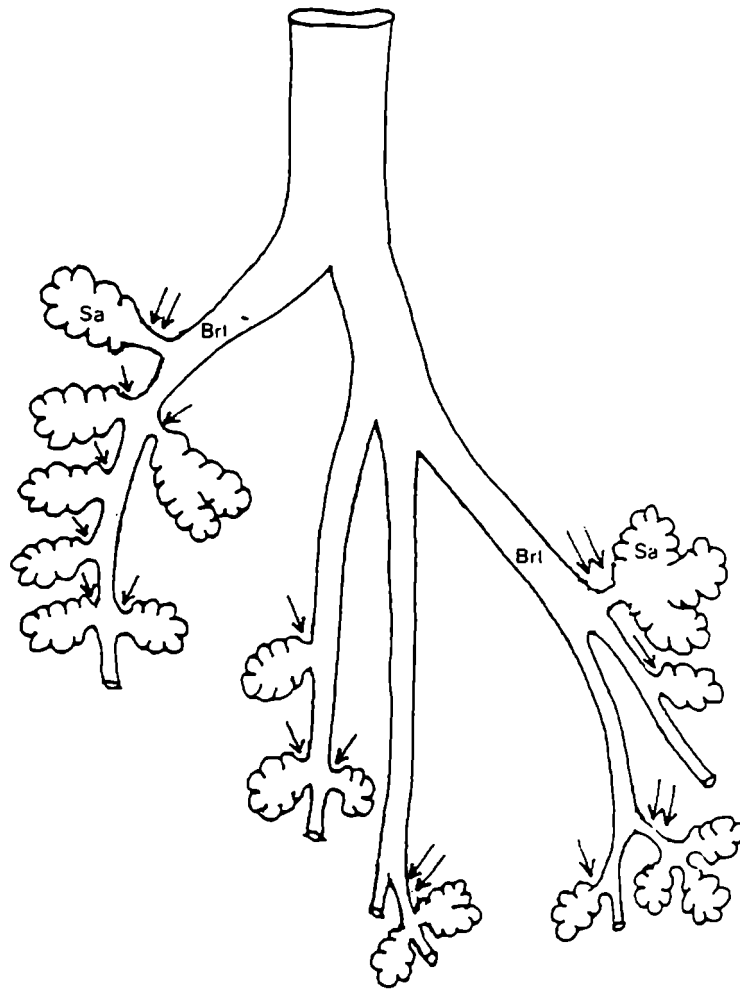


Figura 6: Esquema de la reconstrucción de la región aérea terminal del delfín franciscana (*P. blainvillei*) en donde se destacan la ubicación de los esfínteres mioelásticos.

→ región con esfínteres musculares, ⇨ región con secuencia de esfínteres musculares, **Bt**:bronquiolo terminal, **Sa**:saco alveolar.

7.5.3 Discusión

La existencia de esfínteres mioelásticos en los cetáceos pequeños y su ausencia en los grandes cetáceos, planteó desde un comienzo la necesidad de relacionarlos con los hábitos ventilatorios y de buceo que presentan ambos grupos (Goudappel y Slijper, 1958).

En primer lugar, la capacidad de los delfines para desarrollar buceos prolongados, facilitó la interpretación de que los esfínteres actuarían atrapando el aire en la región alveolar durante las inmersiones, y proveyendo así una fuente de oxígeno de reserva. En los grandes cetáceos (ballenas) estarían ausentes debido a la necesidad de realizar inmersiones más profundas y por más tiempo, evitando así los efectos nocivos del nitrógeno (Lacoste y Baudrimont, 1926; Wislocki, 1929).

En segundo lugar, la presencia de segmentos con número elevado de esfínteres se asoció con un mecanismo que controlaría las variaciones de presión, que se producen en las vías aéreas, durante los rápidos ascensos y que facilitaría las violentas movilizaciones de aire, como ocurre en las marsopas y en los delfines (Belanger, 1940; Goudappel y Slijper, 1958; Ridway, 1972).

Dentro del grupo de los pequeños cetáceos existe poca bibliografía sobre los patrones de actividad de algunos de sus representantes, particularmente en las especies estudiadas en la presente Tesis. Basaremos el análisis morfológico-funcional en los datos existentes, muchas veces incompletos dado la dificultad de rastreo y seguimiento de estos animales.

Ha sido muy común en la bibliografía, el tratamiento de delfines y marsopas como un grupo con patrones fisiológicos y comportamentales muy similares; pero es interesante notar el hallazgo que en tres especies de delfines realizaron Ridway y Johnston (1965). Estos autores encontraron diferencias en algunos parámetros sanguíneos, que según su interpretación tendrían explicación en los diferentes hábitos comportamentales.

Del mismo modo, la morfología diferencial de los esfínteres presentes en las dos especies de delfines estudiadas en el presente trabajo, indujo a asociarlas con los hábitos de vida.

7.5.3.1 ¿Quiénes poseen realmente esfínteres mioelásticos?

Yamasaki y col. (1977), no observaron esfínteres en las vías terminales del delfín franciscana (*P. blainvilei*). Sin embargo, a partir del trabajo llevado a cabo en la presente Tesis se puede concluir que **en el delfín franciscana se encuentran esfínteres en los bronquiolos terminales.**

También Drabek y Kooyman (1983), en una breve referencia manifiestan la existencia de esfínteres en el delfín del Amazonas (*Inia geoffrensis*), en oposición a lo citado por Yamasaki y col. para esta especie.

Esta discusión se extiende más allá de los pequeños cetáceos. Murata (1951) describió "constricciones" en los bronquiolos respiratorios del cachalote, *Physeter macrocephalus*, probablemente atribuibles a esfínteres, mientras que otros autores (Haynes y Laurie (1937); Wislocki y Belanger (1940)) no observaron dichas "constricciones" en esta especie.

Se planteó la misma controversia en los pinnípedos. Harrison y Tomlinson (1963), y King y Harrison (1961) describieron lo que serían esfínteres mioelásticos en los bronquiolos terminales de la foca de Weddell, de la foca de puerto (*Phoca vitulina*), de la foca monje (*Monachus sp.*), y del elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*). Pero Boyd (1975) no describió estas estructuras en su estudio histológico del sistema respiratorio en la foca de Weddell (*L. weddelli*). Este autor planteó como posible explicación para estas contradicciones que durante la administración de anestésicos en procedimientos quirúrgicos para la obtención de muestras, la mayoría de los focos desarrollan una respuesta similar a la que experimentan durante los buceos y que se traduce en un descenso de la tasa cardíaca con un cese de la actividad respiratoria. Esto se evidencia por

el llenado de sangre de la vena cava inferior y sinusoides hepáticos, y en el gran volumen de sangre retenido en los pulmones frescos desinflados. La presencia de sangre retenida en los pulmones sugiere una contracción generalizada de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos en el tejido pulmonar. Si esta respuesta se extiende a la musculatura de las vías aéreas, probablemente podría interpretarse equivocadamente como una serie de esfínteres mioelásticos.

Las observaciones realizadas en esta Tesis, llevan a pensar que **solamente en los pequeños cetáceos se presentan esfínteres mioelásticos verdaderos, aunque por lo observado en el delfín franciscana (*P.blainvilleri*) y en el delfín oscuro (*L.obscurus*), el grado de desarrollo no es el mismo.**

¿Qué es lo que se observa cuando se comparan los hábitos de buceo en especies que presentan esfínteres desarrollados?

Las ventilaciones violentas asociadas probablemente a ciclos de ventilaciones también distintos, y las grandes profundidades de buceo (ver 2.6) son característicos del delfín oscuro (*L.obscurus*). Otras especies de delfines como por ejemplo en el delfín común (*D.delphis*) (Simpson y Gardner, 1972; y observaciones personales) presentan esfínteres muy similares a los descritos para el delfín oscuro y los patrones de actividad serían también semejantes, a pesar de la escasa información existente al respecto.

A partir del presente estudio **se plantea que un análisis conjunto de la morfología diferencial de los esfínteres y los patrones de actividad de cada especie, podría influir en la interpretación del rol funcional de los esfínteres.**

Es conveniente analizar esta hipótesis en dos etapas:

a) en relación a las profundidades de buceo, y **b)** en relación a los patrones de ventilación.

7.5.3.2 Esfínteres mioelásticos y profundidades de buceo

Los esfínteres poco desarrollados aparecen en especies que presentan inmersiones de poca profundidad. Por el contrario, esfínteres mioelásticos completamente desarrollados se encuentran en especies que presentan inmersiones a profundidades mayores que superan los 30 metros, como ocurre en el delfín oscuro (*L.obscurus*) y el delfín común (*D.delphis*).

Ridway y col. (1969), verificaron en una experiencia realizada sobre un ejemplar de tonina (*Tursiops truncatus*), que en profundidades cercanas y superiores a los 100 mts. el consumo de oxígeno es bajo. Esto último coincidiría con la hipótesis funcional planteada por Scholander (1940) en relación a que el cartilago presente en las vías terminales daría rigidez suficiente para permitir la evacuación del aire a esas profundidades, evitando así un elevado pasaje de nitrógeno a la sangre. Ridway y col., en el mismo estudio, verificaron que durante buceos menos profundos (0-70 mts.) el consumo de oxígeno es mayor.

¿Esto ultimo rechaza la posibilidad de interpretar que los esfínteres permitirían retener el aire en los sacos alveolares durante los buceos?

Quizás la respuesta sea negativa. En intervalos de profundidades de 0 - 50 mts.. el peligro de la narcosis no es elevado y sin embargo, el aire comienza a ser expulsado de los sacos alveolares (recordar el rol funcional del cartílago terminal, ver 7.4.3). No disponer de ese aire de reserva implica un costo elevado.

Surge entonces la siguiente interpretación: **un dispositivo que permita retener temporalmente el aire en la región alveolar sería seleccionado positivamente; este rol lo podrían llevar a cabo los esfínteres mioelásticos** (Figura 7).

¿Porqué el delfín franciscana (*P.blainvillei*) presenta un escaso desarrollo en sus esfínteres terminales?. **El delfín franciscana es una especie costera, con poca profundidad de**

buceo (como *I.geoffrensis*) lo que podría asociarse con la ausencia de colapso alveolar en la mayoría de las inmersiones. Por lo tanto no es necesario un mecanismo que permita aprovechar el intercambio gaseoso, típico de situaciones generadas a mayores profundidades en donde comienza el colapso alveolar.

7.5.3.3 Esfínteres mioelásticos y patrones de ventilación

En relación a los patrones de ventilación, también parece existir una diferencia marcada entre representantes con esfínteres poco desarrollados, y especies con esfínteres desarrollados.

El delfín franciscana (*P.blainvillei*), presenta ventilaciones pausadas y poco violentas, asociadas con velocidades de navegación y buceo probablemente mas bajas, que las que presenta por ejemplo el delfín oscuro (*L.obscurus*).

Esta diferencia se hace mas notoria cuando se observan delfines de río (*P.gangetica*, *I.geoffrensis* y *L.vexillifer*), en donde la presencia o ausencia de esfínteres esta todavía sometida a discusión, debido probablemente a su escaso desarrollo.

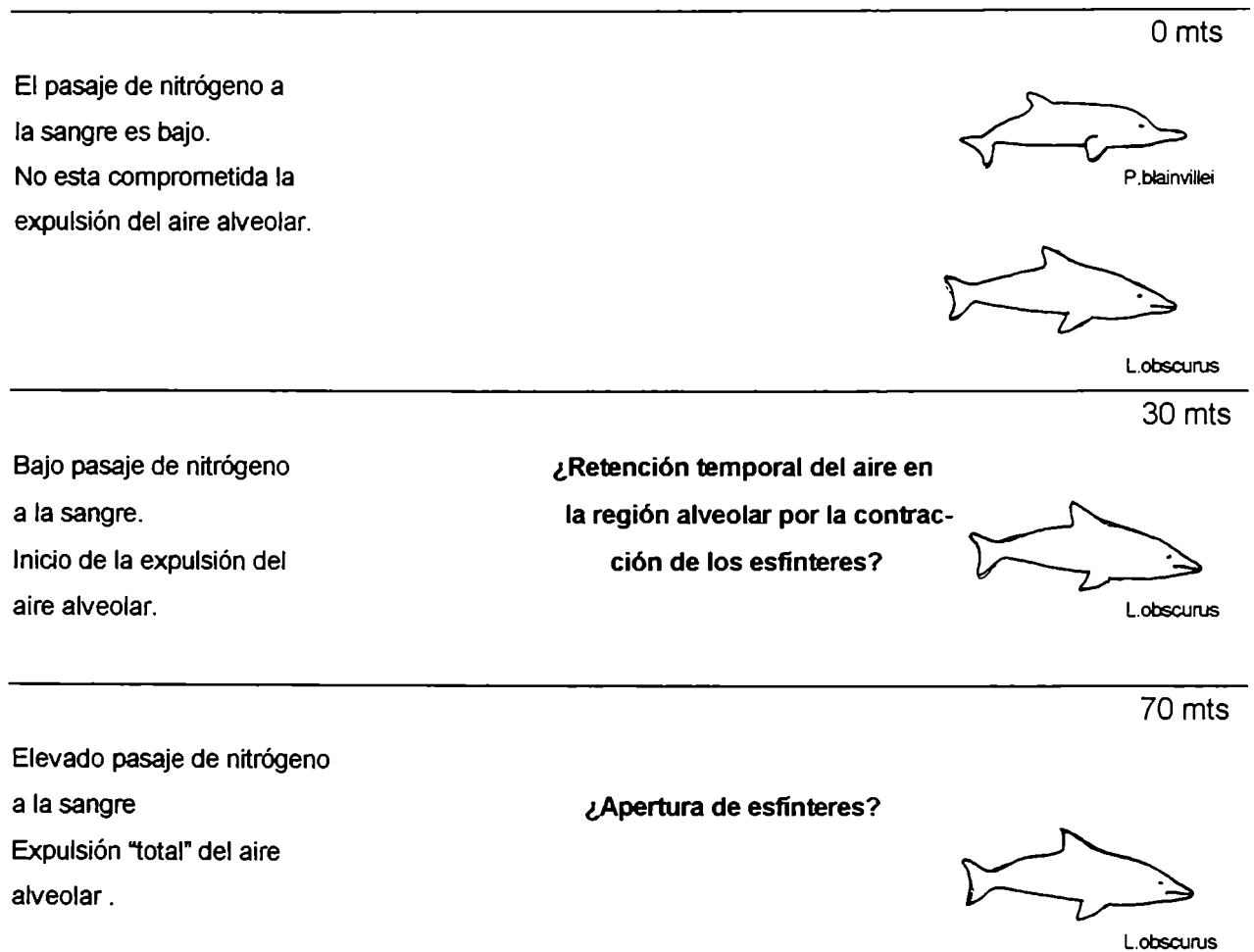
Intercambios de aire mas violentos, movimientos verticales mas rápidos y profundidades mayores de buceo se presentan en cetáceos pequeños como el delfín oscuro (*L.obscurus*).

La observación de esfínteres desarrollados en el delfín oscuro, refuerza la hipótesis sobre el posible control del flujo del aire por parte de las vías aéreas terminales que presentan una secuencia de estas estructuras mioelásticas.

¿Es posible llegar a determinar qué factor es mas importante: profundidades de buceo o patrones de ventilación?

Según los resultados obtenidos y el análisis realizado, no se puede dar a nuestro criterio una opción unívoca; porque quizás mas que una única alternativa funcional, exista un mecanismo complejo que no solo opere en relación al tipo de buceo sino también en relación a los hábitos ventilatorios de cada especie.

Figura 7: Interpretación de uno de los posibles roles funcionales de los esfínteres mioelásticos



PARTE 3

MORFOMETRIA ALVEOLAR EN PINNIPEDOS Y CETACEOS:

Las diferencias estructurales, ¿se asocian a distintas demandas de oxígeno?

7.6 ESTUDIO COMPARADO DE LA MORFOMETRIA ALVEOLAR EN PINNIPEDOS (*Arctocephalus australis* y *Otaria flavescens*) Y EN CETACEOS (*Pontoporia blainvillei*, *Lagenorhynchus obscurus* y *Phocaena spinipinnis*)

7.6.1 Introducción

La tasa metabólica basal (Tm) o el consumo de oxígeno (Cox)¹ en los mamíferos marinos se estimó en pocas especies y generalmente en condiciones de cautiverio. En algunos estudios las especies analizadas presentaron una Tm de 1 a 3 veces mayor que la de los mamíferos terrestres de talla equivalente (Scholander, 1940; Irving y Hart, 1957). La diferencia puede ser mayor si se considera que la grasa corporal en un mamífero marino puede llegar hasta un 40% de la masa corporal (Mc) (Klieber, 1961; Bryden, 1972).

Lavigne y col. (1986) consideraron que en los mamíferos marinos no existen diferencias significativas entre la Tm experimental y la obtenida a partir de incluir la Mc en las ecuaciones alométricas.

Sin embargo, por lo citado en la introducción (ver 3.2) los valores de la Tm obtenidos en cautiverio pueden ser diferentes a los obtenidos en condiciones naturales.

Más aún, es necesario hacer una diferenciación entre la Tm y la tasa metabólica de buceo (Tmb), dado que los ajustes fisiológicos que se producen durante las inmersiones (ver 3.1 y 3.2) pueden modificar notablemente la Tm que presenta el animal en reposo o en superficie.

(1) La determinación del consumo de oxígeno (Cox) se utiliza tan comúnmente para el cálculo de las tasas metabólicas (Tm), que los dos términos a menudo se emplean alternativamente (Schmidt-Nielsen, 1978).

Castellini (1988), diferencia dos condiciones distintas en donde la respuesta metabólica es diferente: a) ejercicio en superficie (apnea + natación), y b) buceo propiamente dicho (inmersiones a mayor profundidad y por períodos de tiempo prolongados).

Teniendo en cuenta que en la mayoría de los mamíferos el volumen pulmonar (V_p) es una fracción constante de la masa corporal (M_c), ¿cómo se ajusta la arquitectura del sistema respiratorio a una mayor demanda de oxígeno?

Una posible solución es el aumento de la superficie alveolar total (S_a). Este aumento puede seguir dos caminos evolutivos: a) incrementar el V_p , o b) aumentar directamente la S_a , a través del incremento de la compartimentalización interna (Tenney y Remmers, 1963). Un aumento de la compartimentalización interna conduce a cambios morfométricos de los alvéolos. Se puede plantear que a V_p equivalentes, alvéolos más pequeños reflejan una mayor compartimentalización pulmonar, y por lo tanto una mayor capacidad de intercambio gaseoso. Esta relación indirecta entre la morfometría alveolar y el intercambio gaseoso, puede ayudar a estimar la T_m de un animal (Tenney y Remmers, 1963).

Dada la escasa información existente sobre la T_m en condiciones naturales de los mamíferos marinos y particularmente de los cetáceos, las preguntas que emergen son las siguientes: 1) ¿qué nos dice la morfometría alveolar en los mamíferos marinos?, y 2) conociendo las diferencias existentes entre la T_m y la T_{mb} , ¿pueden existir variaciones específicas en el Cox calculado teóricamente y el estimado por la morfometría alveolar?

7.6.2 Resultados

Con el fin de evaluar distintos parámetros del parénquima pulmonar, se estudiaron en el Analizador Digital de Imágenes preparados histológicos coloreados con el tricrómico de Masson o con Hematoxilina-eosina a partir de distintas zonas del pulmón de cada una de las especies incluidas en esta Tesis.

7.6.2.1 Análisis del perímetro alveolar

A partir del análisis de los valores medios del perímetro alveolar individual (Pai) obtenidos en cada una de las especies estudiadas, se pudo determinar un grupo conformado por el lobo marino peletero (*A. australis*), el delfín franciscana (*P. blainvillei*) y la marsopa espinosa (*P. spinipinnis*), cuyos Pai promedio fueron 368 (± 72 , n: 40), 457 (± 118 , n: 36) y 426 (± 57 , n: 14) μm^2 respectivamente, y significativamente (ANOVA, contraste de Bonferroni, $p < 0,05$) distintos del grupo conformado por el león marino sudamericano (*O. flavescens*) y el delfín oscuro (*L. obscurus*), cuyos Pai promedio fueron de 776 (± 189 , n: 17) y 663 (± 154 , n: 37) μm^2 respectivamente (Figura 1).

7.6.2.2 Análisis del diámetro equivalente

Esta medición permite proyectar al alvéolo como una esfera, y comparar en base a esta aproximación el tamaño (en volumen) de la unidad. Los valores obtenidos indican que el león marino sudamericano (*O. flavescens*) y el delfín oscuro (*L. obscurus*) presentan alvéolos de un volumen significativamente mayor (ANOVA, contraste de Bonferroni, $p < 0,05$), presentando un diámetro equivalente promedio de 146 (± 30 , n: 17) y 181 (± 43 , n: 37) μm respectivamente. Por otro lado se establece otro grupo conformado por lobo marino peletero (*A. australis*), el delfín franciscana (*P. blainvillei*) y la marsopa espinosa (*P. spinipinnis*), presentando un diámetro equivalente promedio de 86 (± 15 , n: 40), 100 (± 24 , n: 36) y 96 (± 10 , n: 14) μm respectivamente (Figura 2).

7.6.2.3 Análisis de la relación entre largo máximo y largo mínimo alveolar

A partir de la medición del largo máximo (L_{max}) y mínimo (L_{min}) de cada alvéolo (Tabla 1), se calculó el valor del cociente con el objeto de establecer un parámetro que informara respecto de la forma alveolar. Si el valor del cociente es 1, implica que el largo máximo y el largo mínimo del alvéolo son iguales. Esto último permite interpretar al alvéolo como una esfera. El delfín oscuro (*L.obscurus*) presentó el valor más cercano a 1 ($L_{max} / L_{min} = 1,23$), lo que sugiere que esta especie presenta alvéolos mas próximos a una esfera (Tabla 1).

7.6.2.4 Análisis del perímetro alveolar total

Con el fin de aproximar a una estimación del área de hematosis por unidad de volumen pulmonar, se calculó el perímetro alveolar total (Pat) en un campo de observación constante (n). Esta variable se midió en el lobo marino peletero (*A.australis*, n: 10), el delfín franciscana (*P.blainvillei*, n: 9), el delfín oscuro (*L.obscurus*, n: 9) y la marsopa espinosa (*P. spinipinnis*, n: 8). Debido a que el material fijado del león marino sudamericano (*O. flavescens*) para este análisis no estaba en óptimas condiciones, no fue incluido en esta parte del estudio. Algunas de las cuatro especies analizadas se diferencian en sus patrones de buceo (ver 2.3 y 2.6). Mientras que el delfín franciscana explota ambientes costeros y presenta buceos de poca profundidad, el delfín oscuro y la marsopa espinosa se alejan más de la costa y presentan buceos más profundos. Finalmente el lobo fino de dos pelos si bien presenta patrones de buceo similares a la franciscana probablemente su actividad subacuática sea diferente (duración del buceo, velocidad de natación).

El Pat en el delfín oscuro (*L.obscurus*) es significativamente menor (ANOVA, contraste de Bonferroni, $p < 0,05$) al de las otras tres especies (Figura 3). Esto se asocia con el perímetro alveolar mayor y el volumen alveolar mayor, lo que indica una menor superficie de intercambio gaseoso por unidades equivalentes de volumen pulmonar. Se destaca que la marsopa espinosa (*P. spinipinnis*) presenta un Pat intermedio entre el delfín oscuro por un lado y el delfín franciscana (*P.blainvillei*) y el lobo marino

peletero (*A.australis*) por el otro lado. Estas dos últimas especies presentaron el mayor Pat, no existiendo diferencias significativas entre sus valores (Figura 3).

7.6.2.5 Análisis del área alveolar total

El área alveolar total se expresa como el porcentaje promedio, correspondiente al área ocupada por el espacio alveolar en relación al área total del campo observado.

El campo observado (n) fue siempre constante, y la diferencia entre las dos áreas (alveolar y total) se debió al tejido parenquimático, que en mayor o menor grado ocupaba el área del campo analizado. El delfín oscuro (*L.obscurus*, n: 10) presentó el mayor porcentaje correspondiente al espacio alveolar (76,5%), y el lobo marino peletero (*A.australis*, n: 9) junto con el delfín franciscana (*P.blainvillei*, n: 10) presentaron un porcentaje de área alveolar menor y similar entre sí (59,7% y 55,2% respectivamente).

Estas observaciones se relacionan con los valores obtenidos en el perímetro alveolar total (ver 8.6.2.4). El perímetro total bajo, que presentó *L.obscurus* (Figura 3), se asocia al área mayor de espacio alveolar que se observó en esta especie, e implica la existencia de un número menor de alvéolos por unidad de volumen, frente a las otras dos especies analizadas.

7.6.2.6 Variables respiratorias

Con el objeto de relacionar los datos morfométricos de la región alveolar con la fisiología respiratoria de cada especie, se presentan distintas variables respiratorias calculadas a partir de ecuaciones alométricas (Stahl,1967; Schmidt-Nielsen,1984), y aplicadas a la Mc conocida de los ejemplares de cada una de las especies estudiadas (Tabla 2).

En el caso particular del lobo marino peletero (*A. australis*), dado el dimorfismo sexual de esta especie, se presentan los datos calculados para el macho adulto, que fue el sexo estudiado.

Finalmente, se plantea relacionar la morfometría alveolar, la fisiología respiratoria teórica (basada en ecuaciones alométricas en relación a la Mc) y el comportamiento de buceo conocido para las especies estudiadas.

7.6.2.7 Morfometría alveolar, variables respiratorias y comportamiento de buceo

Una de las medidas que mejor estima el intercambio gaseoso es el Pai (Tenney y Remmers, 1963). Sería de esperar que a mayor Vp el Pai se incrementara. Sin embargo cuando se analizó el Pai en función del Vp (Figura 4), esta tendencia no se observó en la marsopa espinosa (*P.spinipinnis*) y en el lobo marino peletero (*A.australis*), en donde a pesar del incremento del Vp , el Pai no varió significativamente. El delfín oscuro (*L.obscurus*) y la marsopa espinosa (*P.spinipinnis*) presentan un Vp similar (3734 ml y 3580 ml respectivamente), aunque sus Pai variaron significativamente.

Lo observado para el Pai en relación al Vp , también se registró cuando se relacionó el Pai con el Cox (Figura 5). Esto es debido a que el Vp y el Cox fueron calculados en base a la Mc .

Si se analiza el Cox en relación a la profundidad de buceo para todas las especies estudiadas, no parece existir una clara relación entre las variables, sin embargo si se toma por separado los otáridos y los delfines se puede observar que a mayor profundidad de buceo hay una tendencia al incremento del Cox (Figura 6).

Cuando se analiza el Pai en relación a la profundidad de buceo no puede establecerse una relación directa entre ambas variables, sin embargo se observa una tendencia que indica que a mayor perímetro alveolar mayor profundidad de buceo (Figura 7).

Tabla 1: Largo máximo y mínimo alveolar promedio

	O.flavescens (n: 17)	A.australis (n: 40)	L.obscurus (n: 37)	P.blainvillei (n: 36)	P.spinipinnis (n: 14)
Largo máximo (Lmax)	212,5 ± 50,8	118,6 ± 23,9	216,6 ± 47,1	153,4 ± 40	129,5 ± 16,5
Largo mínimo (Lmin)	143,9 ± 34,4	82,5 ± 17,1	175,3 ± 46,4	94,6 ± 24,4	96,1 ± 9,9
Lmax / Lmin	1,47	1,43	1,23	1,62	1,34

Se presentan los largos máximos y mínimos de los alvéolos individuales para cada especie. ± : desviación estándar.

Tabla 2: Variables respiratorias estimadas en las especies estudiadas

Variable	O.flavescens	A.australis	L.obscurus	P.spinipinnis	P.blainvillei
Peso (kg)	300 (1)	150 (2)	75 (3)	72 (4)	27 (5)
Vt (ml)	2898	1409	685	657	237
Fr (ven/min)	12,1	14,5	17,4	17,5	22,7
Cox (ml/min)	885,2	522,7	308	299	142
V (ml/min)	36335,9	20869,5	11986	11601	5293
Vp (ml)	15791,4	7679,7	3734,8	3580	1290

Los cálculos se obtuvieron a partir de ecuaciones alométricas (Stahl, 1967; Schmidt-Nielsen, 1978) basadas en la Mc de cada especie (Vt: volumen de intercambio; Fr: frecuencia respiratoria; Cox: consumo de oxígeno; V: tasa de ventilación; Vp: volumen pulmonar). (1) Cappozzo y Rosas (1991); (2) Ximenez y col. (1984); (3) Van Waerebeek (1992); (4) Wursig y col. (1977); Monzon y col. (1991).

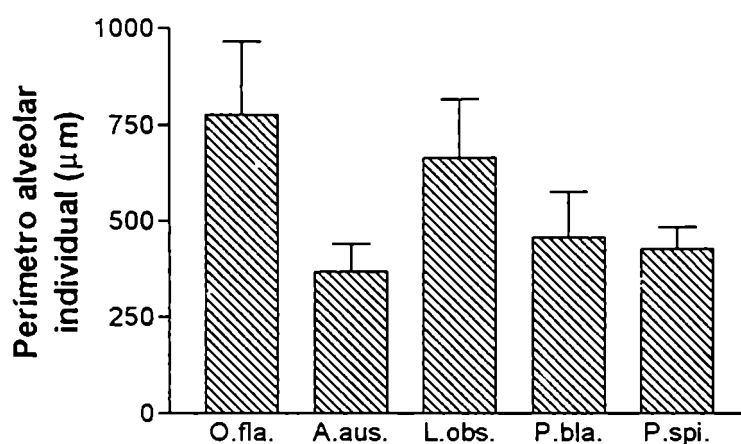


Figura 1: Perímetro alveolar individual. O.fl.: *O. flavescens*, A.aus.: *A. australis*, L.obs.: *L. obscurus*, P.bla.: *P. blainvillei*, P.spi.: *P. spinipinnis* (ANOVA, contraste de Bonferroni, $p < 0,05$, entre A.aus., P.bla. y P.spi. vs. O.fl. y L.obs.).

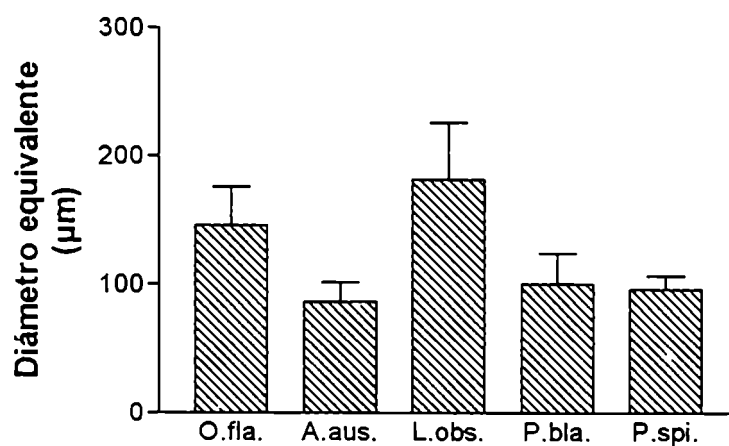


Figura 2: Diámetro equivalente para cada alvéolo. O.fl.: *O. flavescens*, A.aus.: *A. australis*, L.obs.: *L. obscurus*, P.bla.: *P. blainvillei*, P.spi.: *P. spinipinnis*. (ANOVA, contraste de Bonferroni, $p < 0,05$, entre A.aus., P.bla. y P.spi. vs. O.fl. y L.obs.).

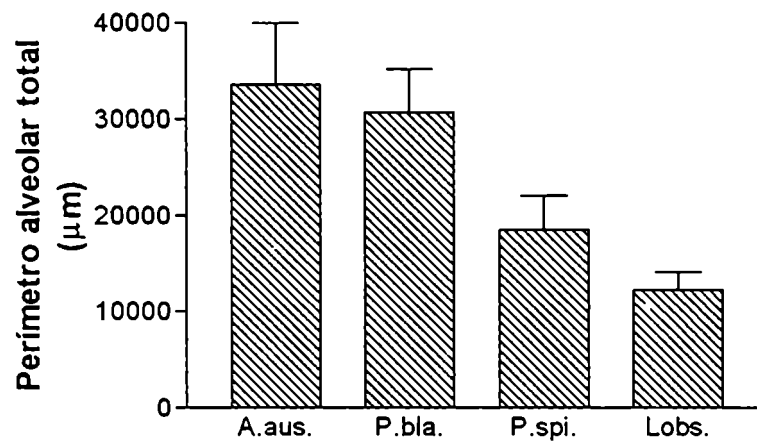


Figura 3: Perímetro alveolar total. Perímetro correspondiente a toda la superficie respiratoria en un campo de observación. A.aus.: *A. australis*, L.obs.: *L. obscurus*, P.bla.: *P. blainvillei*, P.spi.: *Phocaena spinipinnis* (ANOVA, contraste de Bonferroni, $p < 0,05$, entre A.aus. y P.bla. vs. P.spi., y entre A.aus. y P.bla. vs. L.obs.).

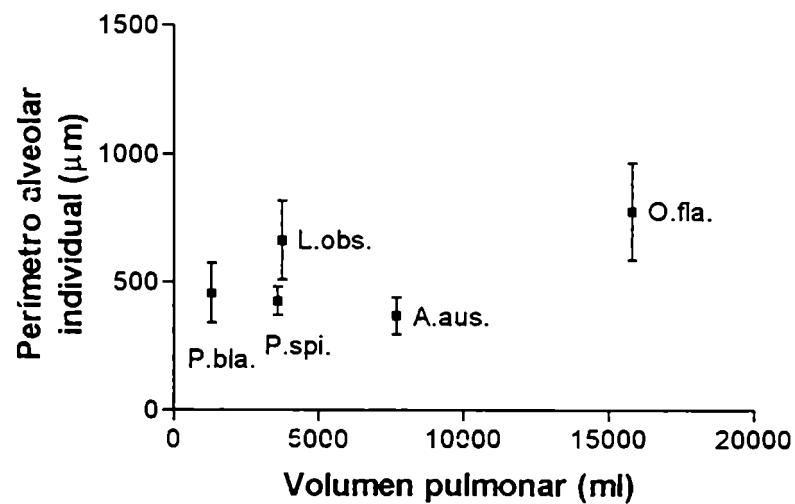


Figura 4: Relación entre el perímetro alveolar individual y el volúmen pulmonar. O. *flavescens*, A.aus.: *A. australis*, L.obs.: *L. obscurus*, P.bla.: *P. blainvillei*, P.spi.: *P. spinipinnis*.

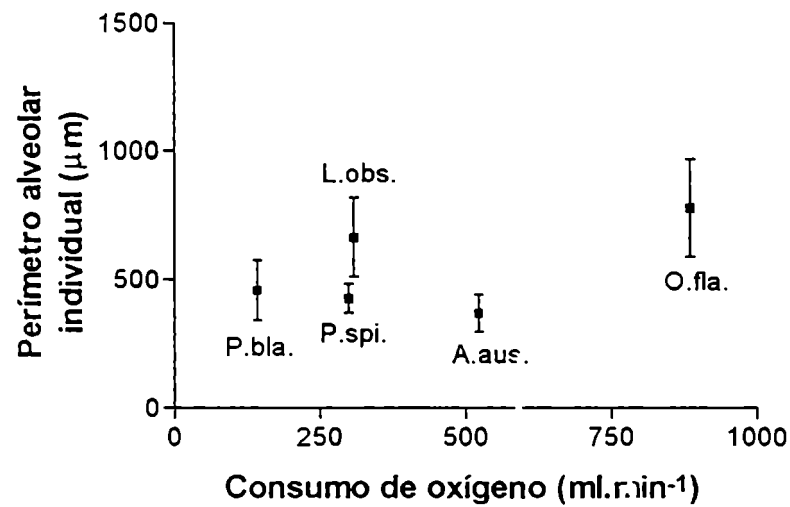


Figura 5: Relación entre el perímetro alveolar individual y el consumo de oxígeno. *O. flavescens*, *A.aus.*: *A. australis*, *L.obs.*: *L. obscurus*, *P.bla.*: *P. blainvillei*, *P.spi.*: *P. spinipinnis*.

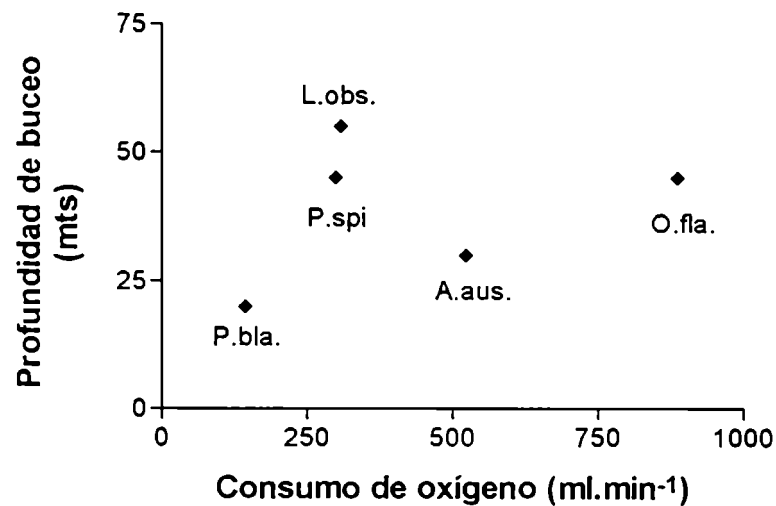


Figura 6: Relación entre la profundidad estimada de buceo (metros) y el consumo de oxígeno teórico (ml.min⁻¹). *O. flavescens*, *A.aus.*: *A. australis*, *L.obs.*: *L. obscurus*, *P.bla.*: *P. blainvillei*, *P.spi.*: *P. spinipinnis*.

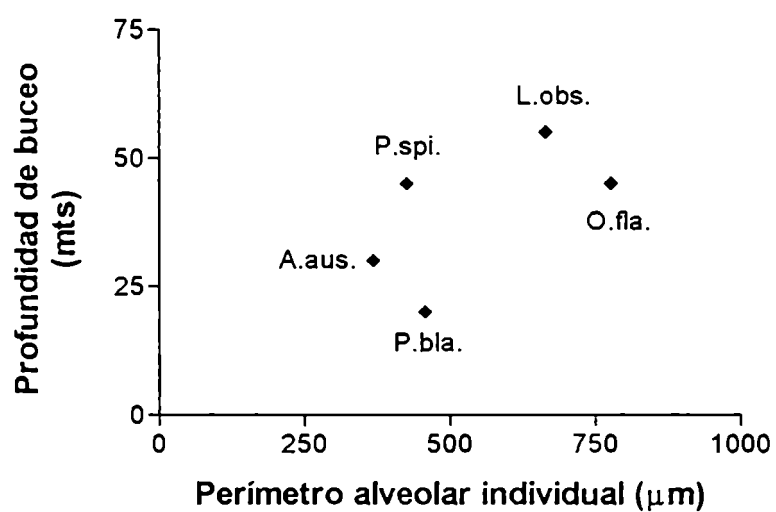


Figura 7: Relación entre la profundidad estimada de buceo (metros) y el perímetro alveolar individual (μm) *O. flavescens*, A.aus.: *A. australis*, L.obs.: *L. obscurus*, P.bla.: *P. blainvillei*, P.spi.: *P. spinipinnis*

7.6.3 Discusión

Inicialmente, al comparar las especies entre si, surge que **la marsopa espinosa (*P. spinipinnis*) y el lobo marino peletero (*A. australis*) presentan un incremento de la superficie alveolar, lo que implicaría un aumento del consumo de oxígeno.**

Sin embargo, existen algunas variaciones en la morfología pulmonar, la actividad subacuática, y la morfometría alveolar que plantean una discusión mas amplia y profunda. Por ejemplo, es probable que el aumento del Vp solo se deba a una mayor Mc y no a una tendencia adaptativa a aumentar la Sa independientemente de la masa (sobre todo si los volúmenes pulmonares se calculan en base a ecuaciones que toman como variable de referencia a la masa). Sin embargo, si se analizan conjuntamente las variables teóricas (obtenidas de las ecuaciones alométricas) y las obtenidas de las muestras estudiadas, los resultados merecen un tratamiento distinto.

7.6.3.1 Perímetros alveolares similares, volúmenes pulmonares distintos.

El león marino sudamericano (*O. flavescens*) presentó el mayor Vp, pero su Pai (tomado como la variable que mejor estima el tamaño alveolar), al igual que el diámetro equivalente, no difieren significativamente del observado en el delfín oscuro (*L. obscurus*). Esto permite concluir que en comparación con el delfín oscuro, el león marino Sudamericano presentó una mayor Sa.

Las otras especies, el lobo marino peletero (*A. australis*), el delfín franciscana (*P. blainvillei*) y la marsopa espinosa (*P. spinipinnis*), presentaron el Pai y diámetros equivalentes, que no difieren significativamente, sin embargo las tres presentan Vp diferentes. El lobo marino peletero presentó el mayor Vp, lo que permite concluir que su Sa es mayor.

Desde este enfoque **se concluye que los dos otáridos (*O. flavescens* y *A. australis*), presentaron una mayor Sa, en relación a los delfines estudiados.** Si se tiene en cuenta que un aumento en la Sa es un indicador de un aumento en el Cox (Tenney y

Remmers, 1963), es posible plantear desde la morfometría alveolar, que los dos otáridos presentarían una Tm mayor.

A partir de esta última conclusión cabe una pregunta: ¿*O.flavescens* y *A.australis* presentan una misma demanda de oxígeno?.

Si se comparan los dos otáridos entre sí, se puede observar que si bien los Vp son distintos, sus Pai y diámetros equivalentes varían proporcionalmente, lo que permite suponer que **las diferencias en la morfología alveolar en el lobo marino peletero y en el león marino sudamericano responden a diferencias de talla corporal y a la proporcional demanda de oxígeno.**

7.6.3.2 Delfines, morfometría alveolar y consumo de oxígeno: ¿distintas estrategias?

La Mc que presentó el delfín oscuro (*L.obscurus*), es semejante a la de la marsopa espinosa (*P.spinipinnis*) (75 kg. y 72 kg. respectivamente), esto se asocia con los Vp similares que presentan ambas especies (3734 ml y 3580 ml respectivamente). Sin embargo, **la marsopa espinosa presentó un Pai significativamente menor, lo que permite concluir que esta especie en comparación con el delfín oscuro presentaría un mayor Cox.** Por otro lado, la marsopa espinosa presentó un Vp casi tres veces mayor que el del delfín Franciscana (*P.blainvillei*). Pero, sus Pai no se diferenciaron significativamente. Esto permite concluir que a igual Pai, **un mayor Vp refleja un incremento en la Sa para la marsopa espinosa en relación a la Sa del delfín Franciscana.**

El delfín oscuro y el delfín Franciscana, se diferenciaron no solo en sus Vp, sino también en sus Pai. Si bien el delfín oscuro presentó un Vp y un Pai mayor, ambas estructuras no se incrementaron proporcionalmente. El Vp del delfín oscuro fué tres veces mayor, pero el Pai solo se incremento en un factor cercano a 1,5, con respecto al delfín Franciscana.

Esto permite interpretar que la Franciscana presenta una mayor Sa en relación al delfín oscuro, lo que implicaría un mayor Cox.

Los valores obtenidos para la proyección volumétrica, conjuntamente con el Pai y el área alveolar, permiten concluir que **el delfín oscuro presentó un volumen alveolar mayor asociado a una menor Sa. Desde la morfometría alveolar, esto plantea que esta especie presentaría una menor Tm que el resto de las especies estudiadas.**

El análisis de la relación existente entre la morfometría alveolar y el consumo de oxígeno en los delfines merece otro enfoque **si se comparan los resultados obtenidos para el Pai (perímetro alveolar individual) y para el Pat (perímetro alveolar total)**. Por los resultados obtenidos para el Pai, se destaca que la marsopa espinosa presentaría un incremento en la Sa, sin embargo al analizar el Pat, se observa que este cetáceo presenta un perímetro alveolar total (perímetro correspondiente a la sumatoria de los perímetros de alveolos en una superficie pulmonar constante, ver 7.6.2.4) intermedio entre el delfín franciscana y el delfín oscuro, lo que **sugiere que el delfín franciscana sería la especie que presenta una mayor Sa, y esto se contradice con lo planteado a partir del Pai.**

¿Cómo puede explicarse esta aparente paradoja? Una explicación posible puede basarse en que los pulmones podrían haber presentado un grado de inflación o deflación diferente, lo que se asocia con el problema de muestreo. De todas maneras todos los delfines murieron por ahogo y el perímetro alveolar puede considerarse que no varió significativamente. Pero otra explicación tendría una respuesta que se basa en una reinterpretación morfológica de la región. El delfín franciscana (*P. blainvillei*) presenta un mayor Pat porque tiene mas alveólos. Esto sugiere que la modificación de la Sa podría no solo asociarse con cambios en la superficie alveolar individual, sino también con una variación en el número de dichas unidades. Esto último llevaría a plantear que tanto el delfín franciscana como la marsopa espinosa presentan un incremento de su Sa.

7.6.3.3 Morfología alveolar, consumo de oxígeno y patrones de buceo

Según algunos autores, el Cox puede descender durante los buceos prolongados (Kooyman y col., 1980; Huntley, 1984). Huntley (1984), también propone que a mayor duración de la apnea o buceo, mayor será el Cox durante la post-apnea o el post-buceo (como pago de la deuda contraída). Se puede plantear entonces, que **el Cox teórico** (calculado mediante la utilización de ecuaciones alométricas en relación a la Mc) **puede presentar modificaciones en relación al tipo de buceo que realice cada especie.**

Cuando se analiza conjuntamente a todas las especies estudiadas no se observa una relación entre el consumo de oxígeno y la profundidad de buceo, pero **si se toma a los cetáceos y a los pinnípedos por separado** (Figura 6) se observa que **dentro de cada grupo el Cox es mayor en especies que bucean a mayor profundidad.**

Por los resultados obtenidos en la morfología alveolar en relación a las profundidades de buceo estimadas se puede observar que existe un incremento del Pai a medida que se incrementa la profundidad del buceo. Esto refuerza la hipótesis que plantea que en buceos profundos existe un descenso del Cox (Boyd, 1997). **Esto permite concluir que si bien el animal responde a la demanda metabólica con ajustes fisiológicos, también puede observarse un ajuste a nivel estructural en la región alveolar.**

Finalmente, es necesario aclarar que las necesidades energéticas no solo estarán asociadas a las profundidades de buceo sino también al tipo de actividad que desarrolle cada especie, aspecto aún bastante desconocido del comportamiento de los mamíferos marinos en condiciones naturales.

7.6.3.4 Cambios en la morfología alveolar en los mamíferos marinos: ¿el ajustarse a distintas demandas de oxígeno fue la única presión evolutiva?

La reexpansión del parénquima pulmonar durante la inspiración es uno de los principales problemas que debe afrontar cualquier mamífero terrestre. Una completa inflación pulmonar requiere la apertura total de todos los pequeños espacios aéreos, como por ejemplo los alvéolos, y esto debe llevarse a cabo en contra de la elevada fuerza que ejerce la tensión superficial de las paredes de dichas unidades respiratorias. Si la reexpansión no es uniforme, algunas regiones pulmonares pueden perder la capacidad de realizar un eficiente intercambio gaseoso.

Durante los buceos, los mamíferos marinos no solo están expuestos a grandes presiones externas, sino que también expulsan el aire residual de la región alveolar con el consecuente colapso de dicha zona. Esto plantea la siguiente pregunta: ¿poseen los mamíferos marinos alguna adaptación que permita una fácil reexpansión pulmonar? (Leith, 1989).

Según Leith (1989), una de las posibles soluciones radicaría en la presencia de grandes espacios aéreos, como los que se observan en las ballenas, que bucean a grandes profundidades. Estas especies presentan alvéolos cinco veces más grandes que los alvéolos humanos. Si las fuerzas de tensión superficial no son distintas, la presión de apertura será menor en un alvéolo de mayor tamaño, facilitando así una fácil reexpansión pulmonar.

A partir de esta conclusión surge la necesidad de replantear el análisis realizado sobre la morfometría alveolar en las especies estudiadas, particularmente para el delfín oscuro (*L. obscurus*).

El delfín oscuro presentó el mayor P_{ai} , lo que permitió plantear que posee un mayor tamaño alveolar, y a partir de esto puede inferirse que presenta una menor S_a . Esto último estaría asociado a un menor Cox (Tenney y Remmers, 1963).

Sin embargo, si el análisis se reenfoca hacia la profundidad de buceo y la reexpansión pulmonar, la interpretación de los datos puede ser distinta. A mayor profundidad de buceo el colapso alveolar es mayor, lo que llevaría a una "costosa" reexpansión pulmonar durante el ascenso y durante la posterior ventilación en superficie, y una posible solución podría hallarse en los grandes tamaños alveolares que presenta esta especie.

Este análisis refuerza la idea que **el diseño del sistema respiratorio en los mamíferos marinos** (por ejemplo: la morfología alveolar) **estuvo dirigido por más de una presión evolutiva, destacándose la necesidad de una ventilación e intercambio gaseoso eficiente, y la necesidad de afrontar con éxito las consecuencias generadas en la anatomía y fisiología a partir del incremento de la presión externa durante el buceo profundo.**

DISCUSION Y CONCLUSIONES GENERALES

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

El diseño del sistema respiratorio en la mayoría de los vertebrados ha sido dirigido por dos procesos fundamentales que se llevan a cabo durante la respiración: el movimiento de aire hacia adentro y afuera del pulmón (ventilación) y el intercambio de gases en la región alveolar (hematosis). Los mamíferos que se adaptaron al medio acuático como los pinnípedos y los cetáceos, pasaron de ser respiradores continuos a ser respiradores intermitentes (Leith, 1989), desarrollando la necesidad de ajustes anatómo-fisiológicos y la necesidad de administrar eficientemente el oxígeno durante los períodos de apnea, surgiendo así otra presión evolutiva que influyó en el diseño del sistema respiratorio en los mamíferos marinos: el almacenamiento de oxígeno.

Las diferentes historias evolutivas de los cetáceos y de los pinnípedos en relación a sus ancestros terrestres (ver 2.1-2.4) plantean la posibilidad de que las potencialidades de cambio estructural fueran distintas en ambos grupos. Estas diferencias se acentúan más si se tiene en cuenta que los cetáceos colonizaron por completo el medio acuático.

El estudio del diseño del sistema respiratorio en distintas especies de mamíferos marinos permite plantear que existen modificaciones estructurales comunes a todos y modificaciones estructurales específicas de algunos representantes (Tabla 1), lo que permite concluir que el diseño del sistema respiratorio no siempre estuvo dirigido por las mismas presiones evolutivas en todas las especies estudiadas.

Los caracteres macroanatómicos, como por ejemplo el patrón de ramificación de las vías aéreas extrapulmonares, la morfología pulmonar y el patrón de ramificación del árbol bronquial intrapulmonar reflejaron claras diferencias entre los cetáceos y los pinnípedos. Esto parece indicar que la colonización absoluta del medio acuático, sumado a los cortos períodos de permanencia en la superficie del agua y a un elevado volumen de intercambio pulmonar exigieron que la ventilación tuviera un protagonismo particular en la evolución de la respiración de los cetáceos,

dado que la morfología general del sistema respiratorio en los pinnípedos responde al diseño básico presente en la mayoría de los mamíferos terrestres.

Esta observación se refuerza por lo observado en la histología de las vías aéreas al registrarse una mayor densidad de glándulas en la submucosa bronquial en los pinnípedos estudiados con respecto a los cetáceos, lo que puede asociarse con la permanencia en tierra que durante varias semanas desarrollan la mayoría de los pinnípedos, exponiéndose así a una mayor cantidad de polvo y contaminantes atmosféricos.

Las características micronanatómicas del sistema respiratorio presentaron rasgos con un desarrollo similar en todas las especies estudiadas, como por ejemplo la presencia del cartílago en las vías aéreas terminales, pero otros rasgos mostraron un desarrollo diferente según la especie que se trate, como por ejemplo la presencia y desarrollo de los esfínteres mioelásticos en las vías aéreas terminales y la morfometría alveolar. Esto permite concluir que **los ajustes a nivel histológico presentaron una gran heterogeneidad. Es probable que el análisis de dicha heterogeneidad microanatómica sea uno de los posibles caminos para comprender cómo desarrollan los buceos las distintas especies de mamíferos marinos.**

Debido a las limitaciones que presentan los estudios directos de la fisiología del buceo en estas especies, la morfología funcional del sistema respiratorio asociada con la ecología comportamental de cada especie, permite replantear distintas interpretaciones sobre qué mecanismos pueden estar disparándose para enfrentar las profundas y prolongadas inmersiones.

A partir de este análisis general propuesto, algunos interrogantes pueden ser reanalizados como por ejemplo: **1)¿porqué aparece el cartílago terminal en especies con poca profundidad de buceo, como el delfín franciscana (*P. blainvillei*), si uno de los principales roles funcionales lo relaciona con inmersiones profundas?**; **2)¿cómo puede interpretarse la presencia de esfínteres escasamente desarrollados en algunas especies de delfines?**; y **3)¿existe algún rasgo estructural del sistema respiratorio que pueda tomarse como un indicador de los hábitos de buceo?**.

1) ¿Porqué aparece el cartílago terminal en especies con poca profundidad de buceo, como el delfín franciscana (*P. blainvillei*), si uno de los principales roles funcionales lo relaciona con inmersiones profundas?

Distintos autores han planteado más de una hipótesis funcional para interpretar la presencia de cartílago en las vías terminales. La hipótesis que más ha sobresalido es la que relaciona el refuerzo terminal con la capacidad de evacuar el aire residual durante las inmersiones profundas y así evitar una elevada narcosis (Scholander, 1940). Sin embargo, Leith (1989) señala que el cartílago en las vías aéreas terminales también se encuentra ampliamente desarrollado en especies que no presentan buceos muy profundos, y esto último se confirma con las observaciones realizadas en la presente Tesis en el delfín franciscana (*P. blainvillei*). Denison y Kooyman (1973) sugirieron otro rol funcional para el cartílago en las vías terminales en un estudio llevado a cabo en pinnípedos. Dicho reforzamiento facilitaría un elevado flujo de aire durante las rápidas y violentas ventilaciones que desarrollan en superficie la mayoría de las especies. No se conoce con exactitud el tipo de ventilación que realiza el delfín franciscana (*P. blainvillei*), sin embargo a partir de nuestras observaciones del reforzamiento terminal en el sistema respiratorio es probable que el rol funcional de esta adquisición estructural en esta especie se limite a facilitar rápidos flujos de aire. Esta última afirmación lleva a plantear que **el reforzamiento de las vías aéreas terminales en los mamíferos marinos presenta más de un rol funcional.**

La existencia de cartílago en las vías aéreas terminales de todas las especies estudiadas refuerza la interpretación de esta estructura como una adquisición generalizada en los mamíferos marinos y reafirma que su presencia responde a un proceso de convergencia evolutiva, y por lo citado anteriormente la fijación de dicho carácter estructural pudo estar influenciada por distintos valores funcionales.

Darwin (1859) planteó que un mismo órgano puede desempeñar a la vez funciones totalmente distintas, y que en tales casos la selección natural podría fácilmente, si derivara de ello algún beneficio, favorecer la especialización en una sola función.

Probablemente el reforzamiento de las vías aéreas terminales en los mamíferos marinos evolucionó como una estructura multifuncional en especies ancestrales que compartían hábitos de buceo, y a medida que las especies ancestrales evolucionaron desarrollaron distintos patrones de actividad y de buceo, llevando al cartilago terminal a cumplir un rol funcional específico en algunas especies (como en el delfín franciscana) o conservando más de un rol funcional en otras.

2) ¿Cómo puede interpretarse la presencia de esfínteres escasamente desarrollados en algunas especies de delfines?.

Las dos principales hipótesis funcionales para esta característica estructural en los delfines plantean: a) por constricción de los esfínteres se produciría la retención de aire alveolar durante las inmersiones, facilitando la hematosis, y b) un sistema de esfínteres puede ser considerado como una adaptación a las fluctuaciones de la presión del aire en los pulmones durante los rápidos movimientos verticales.

Las dos hipótesis se asocian en mayor o menor grado con buceos profundos, lo que permite entender que el delfín franciscana (*P. blainvillei*) posea esfínteres escasamente desarrollados, dado que esta especie presenta inmersiones poco profundas (ver 2.6). Esta observación permite concluir: **los roles funcionales propuestos para los esfínteres musculares no serían necesarios en el delfín franciscana y sumado al escaso desarrollo que presentan en esta especie, puede interpretarse que los esfínteres en la franciscana reflejan un proceso de regresión.** Esto último lleva a plantear que la especie ancestral del delfín franciscana probablemente presentaba esfínteres desarrollados, lo que implicaría que el sentido evolutivo que surge desde el análisis de este carácter estructural sería: delfines de mar abierto y de buceos profundos a delfines costeros y de poca profundidad, esto se refuerza con la mayoría de las historias evolutivas propuestas para los delfines (Evans, 1984).

3) ¿Existe algún rasgo estructural del sistema respiratorio que pueda tomarse como un indicador de los hábitos de buceo?.

El incremento de la superficie alveolar no fue exclusivo de un grupo. De acuerdo a lo observado en este trabajo, el lobo marino peletero (*A. australis*), el león marino

sudamericano (*C.flavescens*) y la marsopa espinosa (*P.spinipinnis*) presentan un incremento de la superficie alveolar, calculado a partir del perímetro alveolar. Esto permite concluir que **determinados aspectos del comportamiento de buceo jugaron un rol clave en el diseño del sistema respiratorio, más allá de tratarse de un delfín o de un otárido**. Esto permite proponer a la morfometría alveolar como un indicador indirecto del consumo de oxígeno de las distintas especies de **mamíferos marinos**, siendo una herramienta muy útil debido a la imposibilidad de llevar a cabo estudios en condiciones naturales sobre el metabolismo en la mayoría de las especies.

En esta Tesis se hallaron y analizaron distintos parámetros morfológicos en el sistema respiratorio cuyo rol funcional se discutió. Algunos son privativos de un grupo taxonómico, otros son privativos de una actividad comportamental, presentándose con distinto grado de desarrollo en un mismo grupo taxonómico.

Debido a los diversos inconvenientes y limitaciones que se presentan al estudiar a los mamíferos marinos bajo un solo enfoque, ya sea el morfológico, el fisiológico o el comportamental, a partir del presente estudio se plantea que el desarrollo y profundización de análisis interdisciplinarios serán la mejor vía para llegar a comprender cómo se adaptaron estos mamíferos a su nueva forma de vida.

Tabla 1: Presencia de distintas características anatomo-histológicas en las especies estudiadas.

	Pinnípedos /		Cetáceos			
	A.aus.	O fla.	P.bla.	P.spi.	L.obs.	D.del.
Tráquea corta	---	---				
Sin lobulación pulmonar	---	---				
Bronquio traqueal	---	---				
Arbol bronquial monopodial extremo	---	D		D	D	D
Incremento del área transversal en las vías aéreas (1)	---	D		D	D	D
Glándulas de la mucosa en tráquea y bronquios intrapul.			---	D	D	D
Esfínteres mioelásticos	---	---				
Cartilago en vías aéreas terminales						
Incremento de la superficie alveolar			---		---	D

A.aus.: *A. australis*, O fla.: *O. flavescens*, P.bla.: *P. balinvillei*, P.spi.: *P. spinipinnis*
L.obs.: *L. obscurus*, D.del.: *D. delphis*. Bloque con color: presencia del carácter
(gris oscuro: característica propia de los cetáceos, gris claro: característica
propia de los pinnípedos, negro: característica compartida total o parcialmente
por ambos grupos), --- : ausencia del carácter, D: desconocido.

(1) Incremento del área transversal de las vías aéreas en las primeras cinco
generaciones de vías intrapulmonares.

BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA

- Andersen, H.T., 1966. Physiological adaptations in diving vertebrates. *Phys. Rev.*, 46: 212-243.
- Arnason, U. y B. Widegren, 1986. Pinniped phylogeny enlightened by molecular hybridizations using highly repetitive ADN. *Mol. biol. and evolution*, 3:356-365.
- Bancroft, J. y A. Stevens, 1990. *Theory and practice of histological techniques*. 3º Edic. Churchill Livingstone.
- Belanger, L.F., 1940. A study of the histological structure of the respiratory portion of the lungs of aquatic mammals. *Am. J. Anat.*, 67: 437-461.
- Berta, A., 1987. Affinities of fossil enaliarctids and their role in pinniped phylogeny. En *Proceed. of seventh bien. conf. biol. mar. mamm.*, dic 5-9, Miami.
- Bordino, P. y M. Iñiguez, 1996. Ecology and Behavior of the La Plata dolphin *Pontoporia blainvillei* in Bahía Anegada, Argentina. En prensa.
- Bordino, P. y G. Thompson, 1997. Patrones comportamentales y estacionales de buceo del delfín franciscana, *Pontoporia blainvillei*, en Bahía Anegada, Argentina. 3º Taller Coord. Invest. y Conser. de la Franciscana en Atlán. Sudocc., Bs. As, Argentina.
- Boshier, D.P. y P. Hill, 1974. Structural aspects of ventilation and diffusion in the Weddell seal (*Leptonychotes weddelli*). *Func. Anat. Mar. Mam.*, (Ed. R. Harrison), 2: 197-229.
- Boyd, I.L., 1997. The behavioural and physiological ecology of diving. *Tren. Ecol. Evol.*, 12 (6): 213-217.

- Boyd, R.B., 1975. A gross and microscopic study of the respiratory anatomy of the Antarctic Weddell seal, *Leptonychotes weddelli*. J.Morph., 147: 309-336.
- Brownell, R. y R. Praderi, 1982. Status of the Burmeister's porpoise, *Phocaena spinipinnis*, in southern american waters. En: Mammals in the seas: small cetaceans, seals, sirenians and otters, FAO Fish. Serv., 5(4): 91-96.
- Bryden, M., 1972. Body size and composition of elephant seals (*Mirounga leonina*): Absolute measurements and estimates from bone dimensions. J. Zool(Lond), 167: 265-276.
- Campagna, C. y B. Le Bouef, 1988. Reproductive behaviour of southern sea lions. Behaviour, 104: 233-261.
- Cappozzo, H.L., 1991. Lobo marino peletero sudamericano, *Arctocephalus australis*. En Estado de conservación de los mamíferos marinos del Atlántico Sudoccidental, Rep. PNUMA, 138: 171-174.
- Cappozzo, H.L. y F.C. Rosas, 1991. León marino sudamericano, *Otaria flavescens*. En Estado de conservación de los mamíferos marinos del Atlántico Sudoccidental, Rep. PNUMA, 138: 166-170.
- Castellini, M., 1988. Visualizing metabolic transitions in aquatic mammals: does apnea plus swimmming equal "diving". Can. J. Zool., 66: 40-44.
- Castellini, M., B. Murphy, M. Fedak, K. Ronald, N. Gofton y P. Hochachka, 1985. Potentially conflicting metabolics demands of diving and exercise in seals. J. Appl. Physiol., 58(2): 392-399.
- Corcuera, J., F. Monzon, E. Crespo, A. Aguilar y A. Raga, 1994. Interactions between marine mammals and the coastal fisheries of Necochea and Claromecó (Bs.As. province, Argentina). Rep. Int. Whale Com, 15: 283-290.

- Crespo, E., 1991. Delfín oscuro, *Lagenorhynchus obscurus*. En Estado de conservación de los mamíferos marinos del Atlántico Sudoccidental, Rep. PNUMA, 138: 166-170.
- Darwin, Ch., 1859. El origen de las especies. Edit. Sarpe, España.
- De Carlo, J.M., A. Hernandez y G. Pellerano, 1976. Algunas consideraciones estructurales del aparato respiratorio de la foca de Weddell (*Leptonychotes weddelli*). Inst. Antar. Arg., cont. 211.
- de Jong, W., 1982. Eye lens proteins and vertebrate phylogeny. En Macromolecular sequences in systematic and evolutionary biology. Ed.M.Goodman, 75-114. New York: Plenum.
- Denison, D. y G. Kooyman, 1973. The structure and function of the small airways in pinniped and sea otter lungs. Resp.Physiol., 17(1): 1-10.
- Drabek, Ch. y G. Kooyman, 1983. Histological development of the terminal airways in pinniped and sea otter. Can J. Zool., 62: 92-96.
- Drabek, Ch. y G. Kooyman, 1986. Bronchial morphometry of the upper conductive zones of four odontocete cetaceans. Res. Dolp. Edits. Bryden y Harrison. Oxford Univ. Press.
- Eisenberg, J., 1981. The mammalian radiations: an analysis of trends in evolution, adaptation and behavior. Chicago Univ. Press.
- Elsner, R., D. Franklin, R. Van Citters y D. Kenney, 1966. Cardiovascular defense against asphyxia. Science, 153: 941-949.
- Elsner, R., A. Blix y J. Kjekshus, 1978. Tissue perfusion and ischemia in diving seals. Physiologist, 21:33.

- Fanning, J.C. y R.J. Harrison, 1974. The structure of the trachea and lungs of the south australian bottle-nosed dolphin. *Func. Anat. Mar. Mam.*, (Ed. R.Harrison),2: 231-252.
- Fiebiger, J., 1916. Respiration in the bottlenosed dolphin. *J. Anat.*,48: 640.
- Gaskin, D.E., 1982. The ecology of the whales and dolphins. Heinemann, London.
- Gazo, M. et L. Cappozzo,1996.- Comportamiento de buceo y transición al destete en crías de foca monje del Mediterráneo (*Monachus monachus*) de la colonia de Cabo Blanco, Sahara Occidental. *Res. VII Reu. Trab. Esp. Mam. Mar. America del Sur*, Santiago de Chile.
- Goddall, R., K. Norris, G. Harris, J. Oporto y H. Castello, 1990. Biología de la marsopa espinosa, *Phocaena spinipinnis*. En En: *Res. 4º Reu. Trab. Esp. Mam. Mar. Amer. del sur*: 46.
- Gonzalez, R., 1991. Delfín común, *Delphinus delphis*. En Estado de conservación de los mamíferos marinos del Atlántico Sudoccidental, Rep. PNUMA, 138: 166-170.
- Goudappel, J. y E. Slijper, 1958. Microscopic structure of the lungs of bottlenosed whale. *Nature*,182: 479.
- Ham, A., 1975. Tratado de histología. 7^{ma} edic., Edit. Interamericana, Mexico.
- Harrison, R. y J. Tomlinson, 1963. Anatomical and physiological adaptations in diving mammals. *Viewpoints in Biol.*, Carthy y Duddington Edits.,2:115-162
- Haynes, F. y A. Laurie, 1937. On the hystological structure of cetacean lungs. *Disc. Report.*, 17: 1-6.

-
- Henk, W.G. y J.T. Haldiman, 1990. Microanatomy of the lung of the bowhead whale, *Balaena mysticetus*. Anat. Rec.,226: 187-197.
- Hochachka, P. y K. Storey, 1975. Metabolic consequences of diving in animals and man. Science, 187: 613-621.
- Horning, M., 1993.- Ontogeny of diving in Galapagos fur seals. Abstracts Tenth Bien. Conf. Biol. Mar. Mam.. Galveston,Texas, pag.:62.
- Horsfield, K. y G. Cumming, 1968. Morphology of the bronchial tree in man. J.Appl. Physiol., 24(3): 373-383.
- Huntley, A., 1984. Determination of basal metabolic rate by extrapolation in mammals that breath periodically. En Marine Mam. Energetics, Edits. A. Huntley y col. Soc. Mar. Mam. Lawrence.
- King, J.E., 1983. Seals of the world. Brit.Mus.Nat.Hist. & Cornell Univ. Press.
- King, J.E. y R. Harrison, 1961. Some notes on the Hawaiian monk seal. Pacif. Sci.,15: 282-293.
- Kjekshus, J., A. Blix, R. Elsner, R. Hol y E. Amudsen, 1982. Myocardial blood flow and metabolism in the diving seal. Am. J. Physiol., 242: 97-104.
- Kleiber, M., 1961. The fire of life. Wiley and Sons, New York.
- Klinowska, M., 1991. Dolphins, porpoises and whales of the world. En The IUCN Red Data Book, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Kooyman, G.L., 1973. Respiratory adaptations in marine mammals. Amer. Zool.,13: 457-468.

- Kooyman, G.L., 1985. Physiology without restraint in diving mammals. *Mar.Mam.Sci.*, 1(2): 166-178.
- Kooyman, G.L., 1989. Diving physiology in marine mammals. En *Comparative Pulmonary Physiology*, S. Wood Ed., Dekker, US.
- Kooyman, G.L., 1989. *Diverse divers: physiology and behavior*. Springer-Verlag, Berlin.
- Kooyman, G. y H. Andersen, 1969. Deep diving. En H. Andersen Edits. *The biology of marine mammals*. Academic Press.
- Kooyman, G.L. y W. Campbell, 1973. Heart rate in freely diving Weddell seals (*Leptonychotes weddelli*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 43: 31-36.
- Kooyman, G.L., J. Schroeder, D. Denison, D. Hammond, J. Wright y W. Bergman, 1972. Blood N₂ tensions of seals during simulated deep dives. *Am. J. Physiol.*, 223: 1016-1020.
- Kooyman, G., E. Wahrenbrock, M. Castellini, R. Davis y E. Sinnett, 1980. Aerobic and anaerobic metabolism during diving in weddell seals: evidence of preferred pathways from blood chemistry and behavior. *J. Comp. Physiol.*, 138: 335-346.
- Kooyman, G.L., M. Castellini y R. Davis, 1981. Physiology of diving in marine mammals. *Ann. Rev. Physiol.*, 43: 343-356.
- Kramer, D., 1988. The behavioural ecology of air breathing by aquatic animals. *Can. J. Zool.*, 66: 89-94.
- Lacoste, A. y A. Baudrimont, 1926. Sur quelques particularites histologiques du poumon due dauphin et l'ans adaptation fonctionelle a la plongee. *Bull.Stat. Biol. d' Arachon*, 23: 87-140.

-
- Lambert, R., 1991. Role of bronchial basement membrane in airway collapse. *J. Appl. Physiol.*, 71(2): 666-673.
- Lavigne, D., S. Innes, G. Worthy, K. Kovacks, O. Schmitz y J. Hickie, 1986. Metabolic rates of seals and whales. *Can. J. Zool.*, 64: 279-284.
- Leatherwood, S. y R. Reeves, 1983. *The Sierra Club Handbook of whales and dolphins*. Sierra Club, San Francisco.
- Le Boeuf, B., D. Costa, A. Huntley y S. Feldkamp, 1988. Continuous, deep diving in female northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *Can. J. Zool.*, 66: 446-458.
- Leith, D., 1989. Adaptations to deep breath-hold diving: respiratory and circulatory mechanics. *Undersea Biomed. Res.*, 16(5): 345-354.
- Lichter, A., 1992. Huellas en la arena, sombras en el mar. Eds. Terra Nova
- Liggins, G., J. Quist, P. Hochachka, B. Murphy, R. Creasy, R. Schneider, M. Snider y W. Zapol, 1980. Fetal cardiovascular and metabolic responses to simulated diving in the Weddell seal. *J. Appl. Physiol.*, 49(3): 424-430.
- Lillie, R.D. y P. Peyyolato, 1972. Histochemical use of borohydrides as aldehyde blocking agents. *Stain Tech.*, 43: 13-16.
- Lydersen, C., 1991.- Monitoring ringed seal (*Phoca hispida*) activity by means of acoustic telemetry. *Can. J. Zool.*, 69: 1178-1182.
- Lydersen, C. et M.O. Hammill, 1993.- Diving in ringed seal (*Phoca hispida*) pups during the nursing period. *Can. J. Zool.*, 71: 991 - 996.

- McManus, J., 1946 Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, 158: 202.
- Majluf, P., 1987. Reproductive ecology of female south american fur seals at Punta San Juan, Peru. Ph.D. Thesis, University of Cambridge.
- Monzon, F. y J. Corcuera, 1990. Análisis preliminar de la madurez sexual en machos del delfín franciscana (Necochea, Prov. de Buenos Aires, Argentina). En: Res. 4º Reu. Trab. Esp. Mam. Mar. Amer. del sur: 46.
- Monzon, F. y J. Corcuera, 1991. Franciscana, *Pontoporia blainvillei*. En Estado de conservación de los mamíferos marinos del Atlántico Sudoccidental, Rep. PNUMA, 138: 16-22.
- Murata, T., 1951. Histological studies of the respiratory portions of the lungs of the cetacea. *Whale Res. Inst. Sci. Rep.*, 6: 35-48.
- Murdaugh, H., E. Robin, J. Millen, W. Drewry y E. Weiss, 1966. Adaptations to diving in the harbor seal: cardiac output during diving. *Am. J. Physiol.*, 210: 176-180.
- Murphy, B., W. Zapol y P. Hochachka, 1980. Metabolic activities of heart, lung and brain during diving and recovery in the Weddell seal. *J. Appl. Physiol.*, 48(4): 596-605.
- Nakakuki, S., 1993. The bronchial tree, lobular division and blood vessels of the harbor seal (*Phoca vitulina*) lung. *Acta. Anat. Nippon*, 68: 497-503.
- Nakakuki, S., 1993. The bronchial tree and lobular division of the lung of the Clifomia sea lion (*Zalophus californianus*). *J. Vet. Med. Sci.*, 55(4): 669-671.
- Novak, R. y J. Paradiso, 1983. Walker's mammals of the world. Vol.2. Baltimore, Md: John Hopkins Univ. Press.

-
- Olsen, C., F. Hale y R. Elsner, 1969. Mechanics of ventilation in the pilot whale. *Resp. Physiol.*, 7: 137-149.
- Pearse, A., 1985. *Histochemistry: theoretical and applied*. 4º Edic., Vol. 1 y 2. Churchill Livingstone
- Phalen, R. y M. Oldham, 1983. Tracheobronchial airway structure as revealed by casting techniques. *Am. Res. Rev. Dis.*, 128(2): 51-54.
- Plopper, Ch., A. Mariassy y L. Lollini, 1983. Structure as revealed by airway dissection. *Am. Rev. Res. Dis.*, 128(2): 54-57.
- Reed, J., C. Chambers, M. Fedak y J. Butler, 1994. Gas exchange of captive freely diving grey seals (*Halichoerus grypus*). *J. Exp. Biol.*, 191: 1-18.
- Renouf, D., 1991. *The behavior of pinnipeds*. Chapman y Hall Ltd., London.
- Repenning, Ch., 1976. Adaptive evolution of sea lions and walruses, *Syst. Zool.*, 25 (4): 375-390.
- Ridway, S., 1972. *Mammals of the sea: Biology and Medicine*. Ch. Thomas, Springfield.
- Ridway, S. y D. Johnston, 1966. Blood oxygen and ecology of porpoises of three genera. *Science*, 151(1): 456-457.
- Ridway, S., B. Scronce y J. Kanwisher, 1969. Respiration and deep diving in the bottlenosed porpoise. *Science*, 166:1651-1653.
- Riedman, M.L., 1990. *The pinnipeds: seals, sea lions and walruses*. Univ. California Press.
- Robinson, N., 1982. Some functional consequences of species differences in lung anatomy. *Adv. Vet. Sci. Comp.*, 26: 1-33.

Ross, M., E. Reith y L. Romrell, 1992. Histología. Edit. Med. Panamericana.

Schlesinger, R. y L. McFadden, 1981. Comparative morphometry of the upper bronchial tree in six mammalian species. *Anat. Rec.*, 199: 99-108.

Schmidt-Nielsen, K., 1978. Fisiología animal: adaptación y medio ambiente. Ed. Omega, Barcelona.

Scholander, P., 1940. Experimental observations of the respiratory function in diving mammals and birds. *Hvda. Skrif., Nors. Viden. Akad, Oslo*, 22: 1-131.

Scholander, P.; L. Irving y S. Grinnell, 1942. Aerobic and anaerobic changes in seal muscles during diving. *J. Biol. Chem.*, 142: 431-440.

Simpson, J. y M. Gardner, 1972. Mammals of the sea: biology and medicine. Edit. S. Ridway. Ch. Thomas Publish., pg: 298-325.

Sinnett, E., G. Kooyman y E. Wahrenbrock, 1978. Pulmonary circulation of the harbor seal. *J. Appl. Physiol.*, 45(5): 718-727.

Slijper, E., 1962. Whales. Basic books. New York.

Stahl, W.R., 1967. Scaling of respiratory variables in mammals. *J. Appl. Physiol.*, 22(3): 453-460.

Tarasoff, F y G. Kooyman, 1973. Observations on the anatomy of the respiratory system of the river otter, sea otter and harp seal 1: The topography, weight and measurements of the lungs. *Can. J. Zool.*, 51(2): 163-170.

Tarasoff, F y G. Kooyman, 1973. Observations on the anatomy of the respiratory system of the river otter, sea otter and harp seal 2. The trachea and bronchial tree. *Can. J. Zool.*, 51(2): 171-177.

- Tenney, S. y J. Remmers, 1963. Comparative quantitative morphology of the mammalian lung: diffusion area. *Nature*, 197: 54
- Testut, T. y A. Latarjet, 1979. Tratado de anatomía humana. III. Edit. Salvat, Barcelona.
- Trillmich, F., G.L. Kooyman, P. Majluf y M. Sanchez Grinan, 1986. Attendance and diving behavior of south american fur seals during El Niño in 1983. En *Fur seals: maternal strategies on land and at sea*. R. Gentry y G. Kooyman edits., Princeton University Press.
- Tyler, W., 1983. Small airways and terminal units. *Am.Rev.Res.Dis.*, 128: 532-536.
- Van Waerebeek, K., 1992. Un análisis de la reproducción del delfín oscuro, *Lagenorhynchus obscurus*, en aguas peruanas. *Anales 5º Reu. Esp. Mam. Acua. Am. Sur*, Buenos Aires.
- Vaz Ferreira, R. y A. Ponce de Leon, 1987. South American Fur Seal, *Arctocephalus australis*, in Uruguay. En *Biology and ecology of fur seals*, NOAA Technical Report NMFS, 51:29-32
- Volz, D., P. Reid, C. Park, D. Owen y W. Dunn., 1987. Histochemical procedures for simultaneous visualisation of neutral sugars and either sialic acid and its side chains O- acyl variants or O-sulphate ester Y. Methods based upon the selective periodate oxidation of sialic acids. *Histochem. J.*, 19: 249-256.
- Weiss, L., 1983. *Histologia*. 5^{ta} edic., Edit. El Ateneo.
- Werner, R. y C. Campagna, 1995. Diving behavior of lactating Southern sea lions (*Otaria flavescens*) in Patagonia. *Can. J.Zool.*, 73:1975-1982.
- Wislocki, G., 1929. On the structure of the lungs of the porpoise (*Tursiops truncatus*). *Am. J. Anat.*, 44(1): 47-77.

- Wislocki, G. y L. Belanger, 1940. The lungs of the larger cetacea compared to those of smaller species. Biol. Bull, 78: 289-297.
- Wursig, M., B. Wursig y J. Mermoz, 1977. Desplazamiento, comportamiento general y un varamiento de la marsopa espinosa, *Phocaena spinipinnis*, en el Golfo San Jose (Chubut, Argentina). Physis (A), 36(92): 71-79.
- Wyss, A. ,1987. Pinnipeds: How many origins and why the controversy? En Proceed. seventh bien. Conf. mar. mamm.,dec 5-9,Miami.
- Yamasaki, F., K. Takahashi y T. Kamiya, 1977. Lungs of *Pontoporia Blainvillei*, with special references to their external aspects, weigths and bronchial ramifications. Okaj. Fol. Anat. Jap., 53(6): 337-357.
- Young, J.Z., La vida de los vertebrados. 2º ed., Edit. Omega. Barcelona.
- Zapol, W., Liggins, G., R. Schneider, J. Quist, M. Snider, R. Creasy y P. Hochachka, 1979. Regional blood flow during diving in the conscious weddell seal. J. Appl. Physiol.,47(5): 968-973.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Lilia Lauria de Cidre, por sus enseñanzas de todos estos años, por su apoyo incondicional en los buenos y los malos momentos, por su eterna paciencia. Muchas gracias "Jefa" por estar, siempre.
- Al Dr. Jorge De Carlo, por permitirme el acceso al Laboratorio en donde se llevó a cabo el presente trabajo y por su colaboración en las consultas realizadas. También hago extensivo este agradecimiento al personal del Laboratorio de Histología Animal.
- Al Dr. Luis Cappozzo, por ayudarme a creer que podía terminar esta Tesis; no es casualidad que comenzara a escribirla definitivamente a su vuelta de España. Muchas gracias Luis.
- A la Dra. Graciela Esnal, por su apoyo y por sus consejos.
- Al Dr. Claudio Campagna, por su apoyo en los trabajos de campo realizados (inolvidables, por cierto) y por aquella larga charla en una sobremesa en Punta Delgada.
- Al Lic. Javier Corcuera y a la Lic. Florencia Monzon, por su apoyo en los trabajos de campo realizados (también inolvidables) y por su aliento.
- Al Lic. Mario Batalles y al resto del personal del ILPE, por su colaboración en el trabajo de campo realizado.
- Al Lic. Mario Ravaglia, por su colaboración en la obtención de algunas fotografías presentadas en esta Tesis.
- Al Dr. Esteban Hasson por tratar de enderezar mis incipientes conocimientos en evolución.

- Al Dr. Hernan Aldana, por su colaboración en la realización de las técnicas histoquímicas y por su aliento permanente.
- Al Dr. Niremborg, por su colaboración para la obtención de las placas radiograficas.
- A Gabriel Rosa, por su colaboración en el uso del Analizador Digital de Imágenes.

Finalmente y a nivel personal:

- A mis padres (Nilda y Olindo) que siempre me apoyaron y confiaron en mi. Si hoy estoy tratando de comenzar una profesión, se los debo a ellos.
- A Silvia, el gran amor de mi vida y mi sol, por su apoyo y aliento permanente.
- A Claudio y Mariana, por su paciencia, por su aliento y por no pedirme mas explicaciones sobre las continuas demoras en la finalización de esta Tesis.
- A Luis, Valeria y sus "princesas" por el aliento y los buenos momentos.
- A Sara y Julio, por su aliento y permanente compania.
- A Gustavo, que a pesar de la distancia esta siempre presente.